



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*  
Discipline ou spécialité : *Physiopathologie*

---

Présentée et soutenue par *Virginie ALBINET*  
Le 30 Novembre 2012

**Titre :** *Rôle de la sphingosine 1-phosphate dans les interactions mélanome-stroma*

---

### JURY

*Pr. Nadem SOUFIR (PU-PH, INSERM U976, Paris) : Rapporteur*  
*Dr. François PARIS (DR, INSERM U892, Nantes) : Rapporteur*  
*Dr. Corine BERTOLOTTA (DR, INSERM U1065, Nice) : Examinatrice*  
*Pr. Bruno SEGUI (PU, Université Paul Sabatier, Toulouse III) : Président du jury*  
*Dr. Nathalie ANDRIEU-ABADIE (CR, INSERM U1037, Toulouse III) : Directrice de thèse*

---

**Ecole doctorale :** *Biologie, Santé, Biotechnologies*

**Unité de recherche :** *INSERM UMR 1037, CRCT*

**Directeur(s) de Thèse :** *Dr. Nathalie ANDRIEU-ABADIE et Pr. Thierry LEVADE*

**Rapporteurs :** *Pr. Nadem SOUFIR, Dr. François PARIS, Dr. Marie-Thérèse DIMANCHE-BOITREL*



*Aux papis...*



## REMERCIEMENTS

*Je tiens tout d'abord à remercier les rapporteurs et membres du jury :*

*Pr. Nadem Soufir, Dr. François Paris, Dr. Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel et Dr. Corine Bertolotto, je vous remercie pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant d'évaluer mon travail de thèse, pour l'intérêt que vous lui avez porté, et pour la discussion enrichissante que nous avons eue au cours de la soutenance.*

*Pr. Bruno Ségui, un grand merci pour avoir accepté de présider ce jury, merci aussi pour tes nombreux conseils et encouragements au cours de ces cinq dernières années.*

*Dr. Nathalie Andrieu-Abadie, merci pour m'avoir choisie pour le stage de M2R, pour m'avoir ensuite confié ce projet de thèse, pour ton soutien, ton encadrement, tes conseils, ta patience...merci pour ces cinq années très enrichissantes !*

*Pr. Thierry Levade, un grand merci pour m'avoir accueillie au sein de votre équipe et pour avoir accepté la co-direction de ma thèse, merci pour votre soutien, pour votre aide, votre disponibilité, votre écoute, vos conseils ainsi que pour votre immense savoir scientifique qui suscite toute mon admiration.*

*Un immense merci à tous les membres de l'équipe :*

*Virginie G, Nicole, Stéphane, Patricia, Léo, Guillaume, Florie, Céline, Hervé, Fred, Julia, Claire, David, et les anciens, Yahya, Julie, Carmen, Caro, Delphine, Anne, Sandra, Elodie... sans oublier Marie-Lise ma binôme en toute circonstance ! Un grand merci à tous pour votre bonne humeur, votre enthousiasme, votre aide sans faille, votre soutien, vos encouragements, pour les innombrables discussions scientifiques mais surtout extra-scientifiques...merci pour ces cinq années !*

*Merci aux stagiaires de passage, Romain, Sandrine, Johann...*

*Merci aux voisins et voisines des autres étages !*

*Merci à Marie-Hélène Renalier pour avoir été ma tutrice au cours de mes trois années de monitorat.*

*Je remercie le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche et la fondation ARC pour la recherche sur le cancer pour avoir financé mes quatre années de thèse.*

*Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement mes proches, mes amis et ma famille pour leur précieux soutien tout au long de mon parcours parfois tumultueux...*

# SOMMAIRE

---

SOMMAIRE .....	5
RESUME EN FRANÇAIS.....	7
RESUME EN ANGLAIS.....	8
INTRODUCTION .....	10
I. LE MELANOME : LE PLUS AGRESSIF DES CANCERS CUTANES .....	12
1. Les carcinomes cutanés : les plus fréquents et les moins graves .....	12
2. Le mélanome cutané: plus rare mais aussi plus grave que les autres cancers de la peau .....	13
2.1. Epidémiologie du mélanome : incidence, mortalité et survie .....	13
2.2 Classification.....	14
2.3. Facteurs de risque .....	15
2.4. Oncogénèse du mélanome cutané.....	20
2.5. Les modèles d'étude du mélanome .....	31
2.6. Le diagnostic du mélanome cutané.....	39
2.7. Les traitements du mélanome cutané .....	43
II. MICROENVIRONNEMENT TUMORAL : IMPORTANCE DU STROMA DANS LA PROGRESSION TUMORALE.....	52
1. Le mélanome est une tumeur hétérogène .....	52
2. Les modifications d'adhésion intercellulaire.....	52
3. Le stroma joue un rôle clé dans l'invasion et la dissémination du mélanome.....	55
4. Les fibroblastes sont les protagonistes de la "stromagénèse" .....	55
4.1. Les différentes origines des CAFs .....	57
4.2. Le rôle des CAFs dans la progression tumorale.....	59
5. Les modèles d'étude.....	70
5.1. Modèles d'interaction tumeur-stroma <i>in vitro</i> en co-culture .....	70
5.2. Modèles d'interaction tumeur-stroma <i>in vivo</i> .....	72
6. Les implications cliniques des CAFs en thérapie anti-cancéreuse .....	74
6.1. Interférence avec les signaux dérivés des CAFs .....	74
6.2. Interférence avec le recrutement et l'expansion des CAFs.....	77
III. LES SPHINGOLIPIDES .....	80
1. Généralités .....	80
1.1. Structure.....	80

1.2. Métabolisme et localisation subcellulaire.....	81
2. Les sphingolipides : des lipides bioactifs .....	84
2.1. Le métabolisme de la S1P.....	85
2.2. Localisation et transport de la S1P .....	102
2.4. Les fonctions biologiques de la S1P - implication dans le cancer.....	109
2.5. Approches thérapeutiques visant la signalisation de la S1P .....	119
OBJECTIF GENERAL DE LA THESE .....	123
RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	126
1. Etude du rôle de la SK1 dans la stromagenèse et la progression du mélanome .....	128
2. Etude de l'effet de la déficience en SK sur la dissémination du mélanome.....	176
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	182
I. Conclusion générale .....	184
II. Perspectives.....	187
MATERIELS ET METHODES.....	192
ANNEXES.....	200
LISTE DES ABREVIATIONS .....	202
LISTE DES PUBLICATIONS.....	206
CHAPITRE DE LIVRE : Genetic disorders of simple sphingolipid metabolism. ....	208
ARTICLE : Disruption of sphingosine 1-phosphate lyase confers resistance to chemotherapy and promotes oncogenesis through Bcl-2/Bcl-xL upregulation.....	252
ARTICLE : Non-lysosomal beta-glucosidase GBA2 as a novel source of glucosylceramide catabolism involved in the regulation of melanoma growth. ....	262
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	273

## RESUME EN FRANÇAIS

Le mélanome métastatique demeure un cancer au sombre pronostic, et aucune des thérapies conventionnelles n'a pu apporter de bénéfice sur la survie globale. Malgré les nombreux progrès réalisés dans la compréhension de la biologie et la génétique du mélanome, peu de traitements efficaces sont actuellement disponibles. De plus en plus de preuves renforcent la notion que le microenvironnement tumoral jouerait un rôle clé dans la progression de ces tumeurs. Les cellules cancéreuses interagissent de façon dynamique et bidirectionnelle avec le stroma à travers des échanges moléculaires modulant le phénotype tumoral. L'objectif de ces travaux de thèse a été de définir le rôle de la sphingosine 1-phosphate (S1P) dans les interactions mélanome-stroma. La signalisation "inside-out" de la S1P lui permet d'agir à la fois sur les cellules tumorales et sur les cellules stromales et souligne l'intérêt de ce métabolite bioactif pour la thérapie ciblée des mélanomes de stade avancé. L'analyse de l'expression des enzymes du métabolisme de la S1P dans des lignées cellulaires de mélanome humain a mis en évidence des altérations en faveur de l'accumulation de S1P dans les cellules malignes en comparaison avec des mélanocytes sains. Cette observation a été confirmée *in situ* dans des tissus tumoraux issus de patients atteints de mélanome. La prolifération et la migration des cellules de mélanome ne sont pas affectées par des modifications d'expression des enzymes du métabolisme de la S1P, mais peuvent être modulées par l'addition de S1P exogène. Ainsi, des fibroblastes dermiques qui sécrètent de la S1P influencent la migration des cellules de mélanome en co-culture. De plus, l'incubation de ces fibroblastes avec du milieu conditionné issu de cellules de mélanome induit l'expression de protéines impliquées dans la différenciation myofibroblastique ainsi que celle de la sphingosine kinase 1 (SK1) par les fibroblastes. Des expériences de tumorigenèse *in vivo* ont permis de montrer que la croissance tumorale locale et les métastases étaient augmentées de façon plus efficace par la co-injection de fibroblastes cutanés sauvages par rapport à des fibroblastes issus de souris *Sphk1*<sup>-/-</sup>. Enfin, tandis que la diminution des taux de S1P plasmatique chez les souris *Sphk1*<sup>-/-</sup> est associée à une inhibition de la croissance et de la dissémination des cellules de mélanome, cette dernière est à l'inverse potentialisée chez les souris *Sphk2*<sup>-/-</sup> qui présentent des taux de S1P plasmatique élevés.

L'ensemble de nos résultats démontre l'implication de la S1P dans les interactions entre le mélanome et son microenvironnement, soulignant l'intérêt de cibler ce sphingolipide bioactif en thérapeutique.



## RESUME EN ANGLAIS

Metastatic melanoma remains an aggressive malignancy conferring a very poor prognosis, and conventional therapies have not demonstrated an overall survival benefit. While significant progress in the understanding of the biology and genetics of melanoma has been made, few effective treatments are currently available. Increasing evidence supports the notion that the adjacent microenvironment plays a key role in the progression of these tumors. Malignant cells actively interact with stroma in a bidirectional manner through molecular signals that modulate tumor phenotype. This thesis aimed at defining the role of sphingosine-1-phosphate (S1P) in melanoma-stroma interactions. The “inside-out” signaling of S1P allowing an action on both tumor and stroma cells makes this bioactive sphingolipid metabolite of particular interest for targeted therapy of advanced melanoma. Expression analysis of S1P-metabolizing enzymes on human melanoma cell lines showed a dysregulation in favor of S1P accumulation in malignant cells as compared to normal melanocytes. This observation was confirmed *in situ* in tumor tissues obtained from patients with melanoma. Neither the proliferation nor migration of cultured melanoma cells were affected by changes of S1P-metabolizing enzymes expression but were modulated by exogen S1P. Thereby, secretion of S1P by dermal fibroblasts impacted on melanoma cells migration in co-culture. Moreover, incubation of those fibroblasts with conditioned medium from melanoma cells induced the expression of myofibroblastic differentiation markers and sphingosine kinase 1 (SK1) by fibroblasts. *In vivo* tumorigenesis experiments showed that local tumor growth and metastases were enhanced more efficiently by co-injection of wild-type skin fibroblasts than by fibroblasts from *Sphk1*<sup>-/-</sup> mice. Finally, reduced S1P levels in the plasma of *Sphk1*<sup>-/-</sup> mice prevented melanoma growth and dissemination while metastases were potentiated in *Sphk2*<sup>-/-</sup> mice displaying high plasmatic S1P levels.

Altogether, our findings demonstrate the implication of S1P in the interactions between melanoma and its microenvironment, pointing out the relevance of targeting this bioactive sphingolipid in therapy.



# INTRODUCTION

---

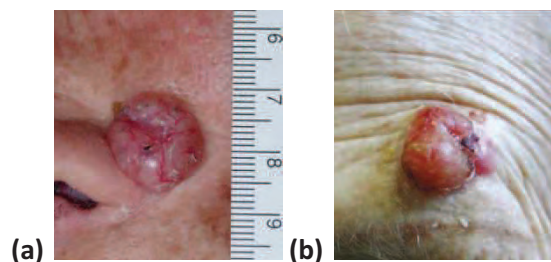


## I. LE MELANOME : LE PLUS AGRESSIF DES CANCERS CUTANES

Les cancers de la peau, carcinomes et mélanomes, figurent parmi les cancers les plus fréquents. En France en 2009, un peu plus de 77000 patients ont été pris en charge dans un établissement hospitalier pour un cancer de la peau (tous types confondus). A l'échelle mondiale, entre 2 et 3 millions de cancers cutanés non mélanocytaires et 132000 mélanomes malins sont enregistrés chaque année (OMS | Cancers cutanés). L'exposition solaire excessive est le facteur essentiel tenu responsable du développement des cancers cutanés. Les patients à peau blanche d'origine européenne sont les principales victimes des carcinomes cutanés, qui sont plus rares chez les patients à peau pigmentée.

### I. Les carcinomes cutanés : les plus fréquents et les moins graves

Les carcinomes cutanés résultent de la transformation maligne des kératinocytes, cellules majoritaires de l'épiderme (Figure 1).



**Figure 1 - Images cliniques de carcinomes cutanés.**

**(a) Carcinome basocellulaire** (Chung, 2012) ; **(b) Carcinome spinocellulaire** (Samarasinghe and Madan, 2012)

Soixante-dix pour cent des carcinomes cutanés sont des carcinomes basocellulaires (Figure 1a). Ce sont les moins graves dans la mesure où ils menacent rarement le pronostic vital. En effet, leur développement, à partir de la couche basale de l'épiderme, reste local. Ils ne donnent jamais de métastases, leur ablation complète assure donc leur guérison. Leur traitement doit néanmoins être précoce car ces tumeurs peuvent s'étendre en surface. Ils surviennent généralement sur peau saine, sur des zones découvertes du corps (tête et cou) et après 50 ans. Ils trouvent le plus souvent leur origine dans une exposition au soleil intense et/ou chronique au cours de la vie.

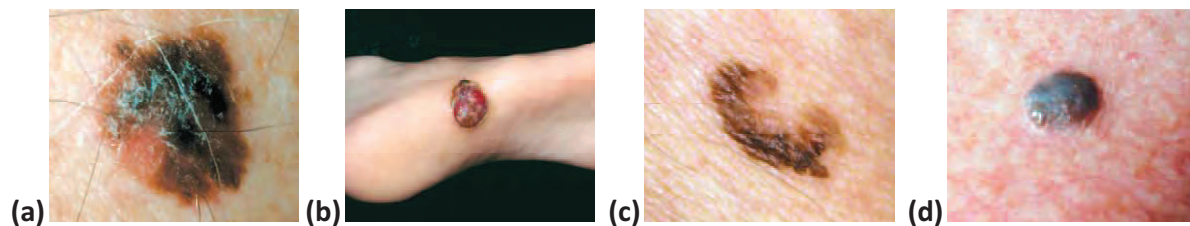
Les carcinomes spinocellulaires ou épidermoïdes (Figure 1b) sont plus rares (20 % des cancers cutanés) mais plus agressifs que les carcinomes basocellulaires. Ils se développent à partir des couches supérieures de l'épiderme et ont la capacité d'envahir les ganglions lymphatiques et de se disséminer dans d'autres organes (métastases). Ils peuvent apparaître sur des cicatrices de brûlure

ou de plaies chroniques. On les rencontre le plus souvent, mais non exclusivement, chez les personnes exposées chroniquement aux rayons du soleil. Ils se voient généralement dans des populations plus âgées que pour les carcinomes basocellulaires.

L'augmentation régulière de la fréquence des carcinomes cutanés (basocellulaires et épidermoïdes) en France résulte de l'effet combiné du vieillissement de la population et d'une incidence croissante chez les sujets âgés.

## 2. Le mélanome cutané: plus rare mais aussi plus grave que les autres cancers de la peau

Le mélanome est la forme la plus agressive et la plus sévère des cancers cutanés (Figure 2). Il résulte de la transformation maligne des mélanocytes, cellules différenciées de l'épiderme responsables de la pigmentation et de la photoprotection via la sécrétion de mélanine. Bien que les mélanomes se développent essentiellement au niveau de la peau, il faut noter qu'ils peuvent également apparaître au sein d'autres tissus comme l'œil et les muqueuses (buccale, œsophagienne, intestinale, nasale, trachéale, vaginale ou vésicale) (Ibrahim and Haluska, 2009).



**Figure 2 - Images cliniques de mélanomes** (Tsao *et al.*, 2004 a).

**(a)** mélanome à extension superficielle (SSM) ; **(b)** mélanome acral-lentigineux ; **(c)** mélanome lentigo malin ; **(d)** mélanome nodulaire.

### 2.1. Epidémiologie du mélanome : incidence, mortalité et survie

Avec 9780 nouveaux cas estimés en France en 2011 (4680 cas chez l'homme et 5100 cas chez la femme), le mélanome cutané se situe au 9ème rang des cancers tous sexes confondus et représente 2,7% de l'ensemble des nouveaux cas de cancers. C'est un des rares cancers dont l'incidence est plus élevée chez la femme que chez l'homme : elle est estimée à 9,7 pour 100 000 hommes et 10,1 pour 100 000 femmes standardisée à la population mondiale en 2011 (melanome-patients.fr | Melanome-patients.info).

Le mélanome cutané est une des tumeurs dont le nombre de nouveaux cas a le plus augmenté ces dernières années puisqu'il a plus que triplé entre 1980 et 2005. Ceci s'expliquerait par l'évolution des habitudes d'exposition au soleil au cours des quarante dernières années.

Près des trois quarts des cas sont diagnostiqués au-delà de 49 ans. En France, en 2005, l'âge moyen au diagnostic était estimé à 60 ans chez l'homme et 58 ans chez la femme.

Le taux de mortalité du mélanome cutané, avec 1620 décès estimés en France en 2011 (900 décès chez l'homme et 720 décès chez la femme), le place au 16ème rang des décès par cancers et représente 1,1% de l'ensemble des décès par cancer.

Le mélanome est un cancer dit « de bon pronostic » lorsqu'il est détecté à un stade précoce, avec un taux de survie relative à 5 ans de 98%. Par contre, lors d'un diagnostic tardif avec une prise en charge au stade disséminé, ce taux chute alors à moins de 15%. La survie à 5 ans varie également en fonction de l'âge, passant de 90 % chez les 15-45 ans à 71 % chez les 75 ans et plus ([www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr))

## 2.2 Classification

### 2.2.1 Classification histologique

Histologiquement, les mélanomes sont classés selon deux indices : l'indice de Clark et l'indice de Breslow (Figure 3).

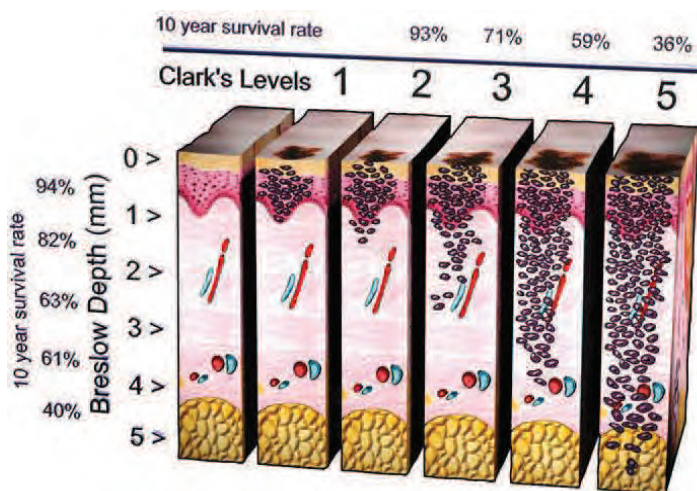


Figure 3 - Représentation schématique des indices de Clark et de Breslow dans le mélanome ([www.med-ars.it](http://www.med-ars.it)).

**L'indice de Clark** traduit le niveau d'infiltration en profondeur de la lésion :

- Clark I : intra-épidermique (mélanome *in situ*).
- Clark II : quelques cellules mélanocytaires atypiques infiltrent le derme papillaire.
- Clark III : infiltration de tout le derme papillaire.
- Clark IV : envahissement du derme réticulaire.
- Clark V : atteinte de l'hypoderme.

**L'indice de Breslow** traduit l'épaisseur en millimètres de la lésion depuis la partie haute de la couche granuleuse jusqu'à la partie la plus profonde de la tumeur. C'est l'indice pronostique le plus

important qui guidera le traitement et le suivi.

### 2.2.2. Formes anatomocliniques

Il existe 4 sous-types histologiques majeurs de mélanomes cutanés :

- **Mélanome à extension superficielle ou superficial spreading melanoma (SSM)**

Cette forme est la plus fréquente (70% des mélanomes) et se caractérise par une évolution en deux phases : dans un premier temps il s'agit d'une extension horizontale et superficielle durant 2 à 5 ans au cours de laquelle la lésion est de bon pronostic, puis, dans un deuxième temps l'extension est verticale avec une infiltration du derme, l'apparition d'un nodule ou d'une ulcération. A ce stade, le pronostic s'aggrave rapidement. (Figure 2a)

- **Mélanome nodulaire ou nodular malignant melanoma (NMM)**

Cette forme représente 20% des mélanomes. Il s'agit d'une tumeur agressive, infiltrant rapidement le derme puis les ganglions lymphatiques. Elle se développe le plus souvent sur peau saine et sur des zones non exposées, particulièrement au niveau du tronc. C'est une lésion d'aspect typique, saillante et de couleur noire ou brune foncée. (Figure 2d)

- **Mélanome acral lentigineux ou acral lentiginous malignant melanoma (ALMM)**

Cette tumeur représente 5% des mélanomes et atteint préférentiellement les sujets à peau noire. Elle se développe au niveau de la plante des pieds, de la paume des mains et des extrémités digitales. Elle a une évolution biphasique (horizontale puis verticale) et a un fort potentiel d'agressivité et d'invasion qui lui confère un mauvais pronostic. (Figure 2b)

- **Mélanome lentigo malin, lentigo malignant melanoma (LMM) ou mélanose de Dubreuilh**

Cette forme concerne 5% des mélanomes et survient de façon quasi exclusive chez les personnes âgées (>60 ans). Il s'agit d'une tumeur intra-épidermique qui évolue très lentement sur plusieurs années (5 à 15 ans), présentant une extension superficielle avant que l'invasion verticale ne débute. Elle se développe le plus souvent sur le visage, les joues, les tempes et le front. (Figure 2c)

### 2.3. Facteurs de risque

Le mélanome peut soit apparaître *de novo*, soit résulter de la transformation maligne d'un *nævus*. Les données de la littérature suggèrent que 70-80 % des mélanomes surviennent *de novo* (Rivers, 2004). Les mécanismes d'apparition des mélanomes ne sont pas complètement élucidés : si



les études épidémiologiques ont montré une corrélation entre une exposition solaire brutale et intense (brûlure solaire) et l'apparition d'un mélanome, ce cancer peut survenir sur des zones cutanées non exposées au soleil.

### 2.3.1. Facteurs liés à l'individu

Le risque de mélanome est majoré par des facteurs individuels constitutifs permettant de définir les sujets à risque :

- *Phototype et caractéristiques physiques des sujets*

Le phototype caractérise la sensibilité de la peau aux rayonnements ultraviolets (UV). Il existe six phototypes correspondant à six types de peaux et de couleurs de cheveux (Tableau 1).

phototype	couleur de peau	Couleur des cheveux	yeux	tâches de rousseur	coups de soleil	aptitude au bronzage
I	très blanche	blonds ou roux	bleus/verts	souvent	systematiques	aucune
II	claire	blonds roux à châains	clairs à bruns	parfois	fréquents	hâle très léger
III	intermédiaire	châains à bruns	bruns	peu	occasionnels	hâle clair
IV	mate	bruns	bruns	non	occasionnels	hâle foncé
V	brun foncée	bruns à noirs	bruns à noirs	non	rares	hâle très foncé
VI	noire	noirs	noirs	non	très exceptionnels	noir

**Tableau 1 - Description des différents phototypes.**

Le phototype constitue un facteur de risque majeur. Plus la peau, les cheveux et les yeux d'une personne sont clairs (phototype faible), plus le risque de mélanome est important (Gandini *et al.*, 2005 b).

- *Nombre de nævi communs et/ou atypiques*

Des études ont montré que le nombre de nævi communs et de nævi atypiques était un facteur indépendant fort pour l'occurrence d'un mélanome. Le risque relatif (RR) d'avoir un mélanome est d'autant plus élevé que le nombre de nævi communs ou de nævi atypiques est important (Gandini *et al.*, 2005 a).

- *Nævus congénital géant*

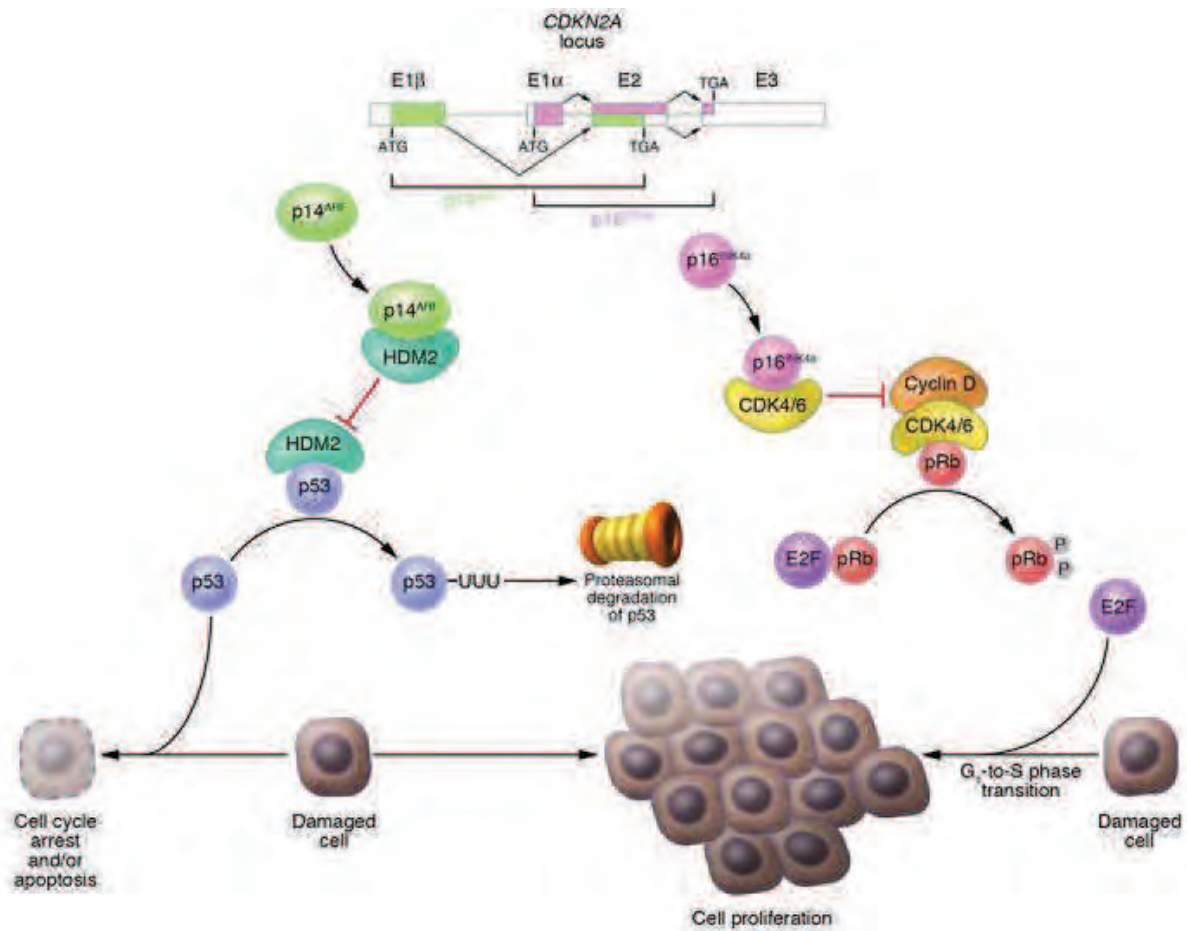
L'existence d'un nævus congénital géant (nævus >20cm de diamètre présent à la naissance) augmenterait de 2,4 fois le risque de développer un mélanome (Watt *et al.*, 2004).

- *Antécédent familial de mélanome*

Les antécédents familiaux de mélanome sont définis par l'existence d'un mélanome chez : soit 2 membres de la parenté du premier degré, soit 3 membres de la famille quel que soit le degré de parenté. Cinq à dix pour cent des mélanomes surviennent dans un contexte familial. Une des études de Gandini *et al.* évaluait à 1,7 le risque relatif de développer un mélanome chez un sujet ayant des antécédents familiaux de mélanome (Gandini *et al.*, 2005 b).

- *Gènes de prédisposition*

L'analyse de mélanomes familiaux a permis d'identifier des gènes de susceptibilité pour le développement de mélanome. Deux gènes très fréquemment mutés ont été mis en évidence : *CDKN2A* et *CDK4*. Le gène *CDKN2A*, situé sur le chromosome 9p21, a une organisation particulière (Figure 4) et code pour deux protéines suppresseurs de tumeur : INK4A (aussi connue sous le nom de p16) et ARF (aussi appelée p14 chez l'humain ou p19 chez la souris). Les mutations de ce locus contribueraient à 25-40% des cas de mélanomes familiaux. Ces deux protéines interviennent négativement dans la régulation du cycle cellulaire : INK4A inhibe la phosphorylation et l'inactivation de RB (Rétinoblastome) médiée par CDK4/6 et ARF inhibe la dégradation de p53 suite à son ubiquitination médiée par MDM2 (HDM2 chez l'humain). La délétion de ces deux protéines, en combinaison avec des mutations activatrices de HRAS ou NRAS dans les mélanocytes, entraîne le développement spontané de mélanomes chez la souris (Chin *et al.*, 1997; Whitwam *et al.*, 2007). D'autre part, l'expression d'une forme mutée de Cdk4 (Cdk4<sup>R24C</sup>) chez la souris se traduit par un phénotype similaire avec une sensibilité accrue à la formation de mélanome suite à des traitements par des carcinogènes (Sotillo *et al.*, 2001).



**Figure 4 - Structure génétique et mécanisme d'action des suppresseurs de tumeur p16<sup>INK4a</sup> et p14<sup>ARF</sup>** (Chudnovsky *et al.*, 2005).

Le locus de *CDKN2A* sur le chromosome 9p21 est composé de 4 exons (E) - 1α, 1β, 2 et 3 - et code pour 2 suppresseurs de tumeurs, p16<sup>INK4a</sup> et p14<sup>ARF</sup> (appelé p19<sup>ARF</sup> chez la souris), via différents cadres de lecture ouverts. La protéine p16<sup>INK4a</sup> est traduite à partir du produit d'épissage de E1α, E2 et E3 alors que p14<sup>ARF</sup> est issu de la traduction du produit d'épissage de E1β, E2 et E3. En conditions normales, p16<sup>INK4a</sup> séquestre CDK4 et CDK6 maintenant ainsi pRb dans un état hypophosphorylé. En l'absence de p16<sup>INK4a</sup>, CDK4 et CDK6 se lient à la cycline D et phosphorylent pRb. pRb phosphorylé libère alors le facteur de transcription E2F, qui promeut la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. D'autre part, p14<sup>ARF</sup> séquestre l'ubiquitine-ligase spécifique de p53, HDM2. En l'absence de p14<sup>ARF</sup>, HDM2 entraîne l'ubiquitination (UUU) de p53 qui est alors dégradé par le protéasome, et la perte de p53 altère les mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire et/ou d'apoptose en cas de cellules génétiquement endommagées, aboutissant alors à leur prolifération. La perte de *CDKN2A* contribue ainsi à la tumorigénèse en perturbant à la fois les voies de pRb et de p53.

Un autre gène de prédisposition mis en évidence est le gène *MC1R*. Il code pour le récepteur transmembranaire de la mélanocortine responsable de la pigmentation ainsi que de la protection contre les UV via la synthèse de mélanine. Des variants de ce gène ont été associés à un risque accru de mélanome (pour revue (Nelson and Tsao, 2009)). De même, les personnes porteuses de mutations dans le gène du rétinoblastome *RB1* ont 4 à 80 fois plus de risque de développer un mélanome au cours de leur vie (pour revue (Chin *et al.*, 2006)).

De plus, récemment, une mutation germinale affectant un site de sumoylation du facteur de transcription MITF a été identifiée. Il s'agit d'une mutation faux-sens favorisant sa liaison et son activité transcriptionnelle au niveau du promoteur de HIF1A. Ainsi, cette mutation augmenterait de plus de cinq fois le risque de développer un mélanome (Bertolotto *et al.*, 2011).

### **2.3.2. Facteurs liés à l'environnement**

Toutes les études réalisées montrent que l'exposition aux rayonnements ultraviolets (UV) est un facteur majeur dans le développement des cancers de la peau. On estime que deux tiers des mélanomes sont dus à une exposition excessive au soleil, cette proportion étant plus élevée encore chez les personnes à la peau claire.

- *Exposition solaire*

Les trois types de rayonnements ultraviolets émis par le soleil (UVA, UVB, UVC) se distinguent par leur intensité, leur longueur d'onde et leur capacité à pénétrer la peau plus ou moins profondément. Les UVA représentent 95% des UV qui arrivent à la surface de la terre, les UVB, 5%. Les UVC sont quant à eux filtrés par la couche d'ozone.

Alors que l'on croyait auparavant que seuls les rayons ultraviolets très énergétiques (UVB) provoquaient des cancers, on sait aujourd'hui que les ultraviolets moins énergétiques (UVA) y contribuent autant.

Les études épidémiologiques ont démontré que l'exposition au soleil pendant l'enfance, notamment l'exposition intermittente et intense qui provoque les coups de soleil, est un déterminant majeur dans la survenue du mélanome à l'âge adulte. Ces risques ont été validés expérimentalement chez la souris transgénique surexprimant le facteur HGF/SF (hepatocyte growth factor/scatter factor), ligand du récepteur tyrosine kinase c-Met, régulant la croissance, la motilité et l'invasion cellulaires. Une irradiation à faible dose d'UV au stade néonatal, contrairement à l'adulte, induit le développement de mélanome chez ces animaux après une courte période de latence (Noonan *et al.*, 2001).

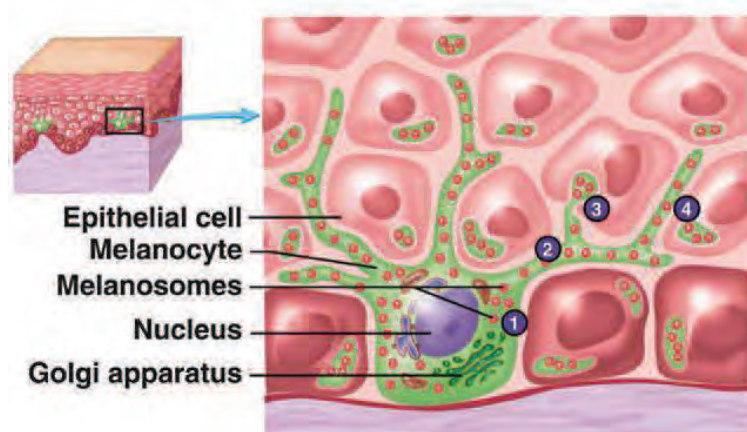
- Exposition aux UV artificiels

Il est désormais prouvé que l'exposition aux ultraviolets artificiels des cabines de bronzage (UVA) est associée à un risque accru de développement de cancers cutanés, notamment de mélanomes (Autier *et al.*, 2011).

## 2.4. Oncogenèse du mélanome cutané

### 2.4.1. Le développement normal des mélanocytes

Les mélanocytes sont des cellules pigmentées présentant une morphologie assez particulière avec des prolongements dendritiques (Figure 5). On en trouve dans la peau, l'œil, l'oreille interne et les muqueuses. Au niveau de la peau, ils sont situés entre les kératinocytes de la couche basale (jonction dermo-épidermique), l'ensemble formant une unité de mélanisation avec en moyenne 1 mélanocyte pour 36 kératinocytes. Leur fonction est la synthèse de mélanines, eumélanines et phéomélanines, qui donnent à la peau sa couleur constitutive et assurent la photoprotection (eumélanines). La mélanine est accumulée dans des granules spécialisés appelés mélanosomes qui sont transférés aux kératinocytes adjacents afin de protéger leur ADN des rayonnements UV (Figure 5) (pour revue (Park *et al.*, 2009)).



**Figure 5 - Représentation schématique d'un mélanocyte.**

(<http://blog.dearbornschools.org/enkom/2010/10/>)

Situés dans la couche basale de l'épiderme, les mélanocytes synthétisent de la mélanine dans les mélanosomes qui sont ensuite transférés aux kératinocytes par les extensions dendritiques afin de les protéger des rayonnements UV.

#### 2.4.1.1. Événements précoces dans la crête neurale

Les mélanocytes dérivent d'un groupe de cellules embryonnaires migratoires appelé la crête neurale. L'induction précoce de la crête neurale au stade embryonnaire de la gastrulation est en partie dépendante de la signalisation BMP (Bone Morphogenetic Protein). Après induction, les cellules subissent une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) au cours de laquelle elles perdent l'expression de molécules d'adhésion comme la E-cadhérine pour acquérir un potentiel

migratoire et coloniser les différents tissus. La famille de facteurs de transcription Snail/Slug joue un rôle important dans ce processus. Ces cellules initialement multipotentes vont se différencier au cours du développement pour devenir mélanocytes, neurones et cellules gliales, cellules cardiaques, tissu craniofacial et médullosurrénale. Les protéines de la famille Notch sont importantes pour le développement des cellules de la crête neurale et leur activation est essentielle pour la diversification et le devenir des progéniteurs. L'importance de Notch dans la génération des précurseurs des mélanocytes est soulignée par le caractère létal du mutant déficient pour l'E3-ubiquitine-ligase indispensable à la signalisation Notch. En effet, ce mutant généré chez le poisson zèbre présente une absence complète de dérivés de la crête neurale, y compris les cellules pré-migratoires et les mélanocytes différenciés dans la région crânienne (pour revue (Lin and Fisher, 2007; Uong and Zon, 2010; White and Zon, 2008)).

#### **2.4.1.2. Des cellules souches aux mélanocytes**

Le passage d'une cellule souche de la crête neurale multipotente à un mélanocyte mature passe par un stade de progéniteur bipotent cellule gliale-mélanocyte qui se développe en un précurseur non pigmenté appelé mélanoblaste, qui va migrer au niveau de l'épiderme et des follicules pileux. Cette orientation vers le mélanoblaste et le mélanocyte mature met en jeu la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine. En effet, les souris déficientes en Wnt n'ont pas de mélanoblaste (Ikeya *et al.*, 1997) et la surexpression de  $\beta$ -caténine chez le poisson entraîne l'expansion de mélanocytes et la perte de dérivés de cellules gliales (Dorsky *et al.*, 1998).

Le mécanisme par lequel la voie Wnt/  $\beta$ -caténine influence le lignage mélanocytaire passerait par l'activation de MITF, facteur de transcription particulièrement important dans le développement des mélanocytes. La perte de MITF (Microphthalmia-Associated Transcription Factor) entraîne l'absence de mélanocytes chez la souris et le poisson zèbre. MITF régule l'expression de gènes de production de pigments tels que *DCT* (dopachrome tautomerase) et *TYR* (tyrosinase) mais également du gène anti-apoptotique *BCL2* assurant ainsi la survie des mélanoblastes (Hornyak *et al.*, 2009).

Le récepteur tyrosine-kinase c-kit et son ligand kitL ou SCF (Steel/Stem Cell Factor) sont également impliqués dans le développement des mélanocytes. Des mutations de c-kit sont associées à des défauts de pigmentation chez l'humain (piébaldisme) ainsi que chez la souris. Kit et son ligand jouent un rôle dans le développement, la migration et la survie des mélanocytes mais ce rôle semble varier selon les espèces : chez la souris ils interviendraient dans la migration des mélanoblastes alors que chez le poisson zèbre il s'agirait plutôt de leur survie (pour revue (White and Zon, 2008)).

Les endothélines ont également leur importance dans le développement des mélanocytes et plus particulièrement dans la migration et la survie des mélanoblastes. Les souris déficientes pour le récepteur à l'endothéline-B (EDNBR) ou son ligand (ET3) démontrent une absence de mélanocytes (Baynash *et al.*, 1994).

#### **2.4.1.3. Régénération des mélanocytes : les cellules souches mélanocytaires**

Avec le système hématopoïétique, la peau est l'organe qui se régénère le plus chez l'homme adulte. Chaque jour, des millions de cellules épidermiques et de poils sont renouvelés, chacun pigmenté à l'identique par les mélanocytes. Chez l'humain, la coloration du poil se fait par transfert de mélanine d'un mélanocyte différencié, situé à la base du follicule pileux, à la nouvelle tige pileuse. Dans la peau elle-même, les mélanocytes transfèrent la mélanine aux kératinocytes de "l'unité de pigmentation".

La recherche d'un "réservoir" de mélanoblastes permettant de renouveler les mélanocytes épidermiques a abouti à l'identification de cellules souches de mélanocytes. Ces études ont été réalisées chez la souris transgénique exprimant le gène *LacZ* sous le contrôle du promoteur *Dct* spécifique du lignage mélanocytaire et ont mis en évidence l'existence d'une niche au niveau du renflement du follicule pileux (Nishimura *et al.*, 2002). Les cellules y sont maintenues dans un état quiescent indifférencié pouvant s'auto-renouveler et ont la capacité de proliférer et se différencier en mélanocyte mature en réponse à des stimuli (UV, cicatrisation...). La survie de cette population cellulaire est indépendante de kit, par contre MITF et Bcl-2 ont un rôle critique dans son maintien. De même, le microenvironnement fourni par la niche est déterminant et la proximité avec les cellules souches des kératinocytes promeut la quiescence et l'immaturité de ces cellules via la sécrétion de TGF- $\beta$ . La signalisation de Notch est importante à la fois pour le développement du mélanocyte et pour la survie des cellules souches mélanocytaires. Il a également été suggéré que la voie Wnt et le facteur de transcription Pax3, tous deux en amont de MITF, participeraient au maintien de cette population, mais des études supplémentaires sont nécessaires avant d'affirmer leur rôle critique (pour revue (Nishimura, 2011)).

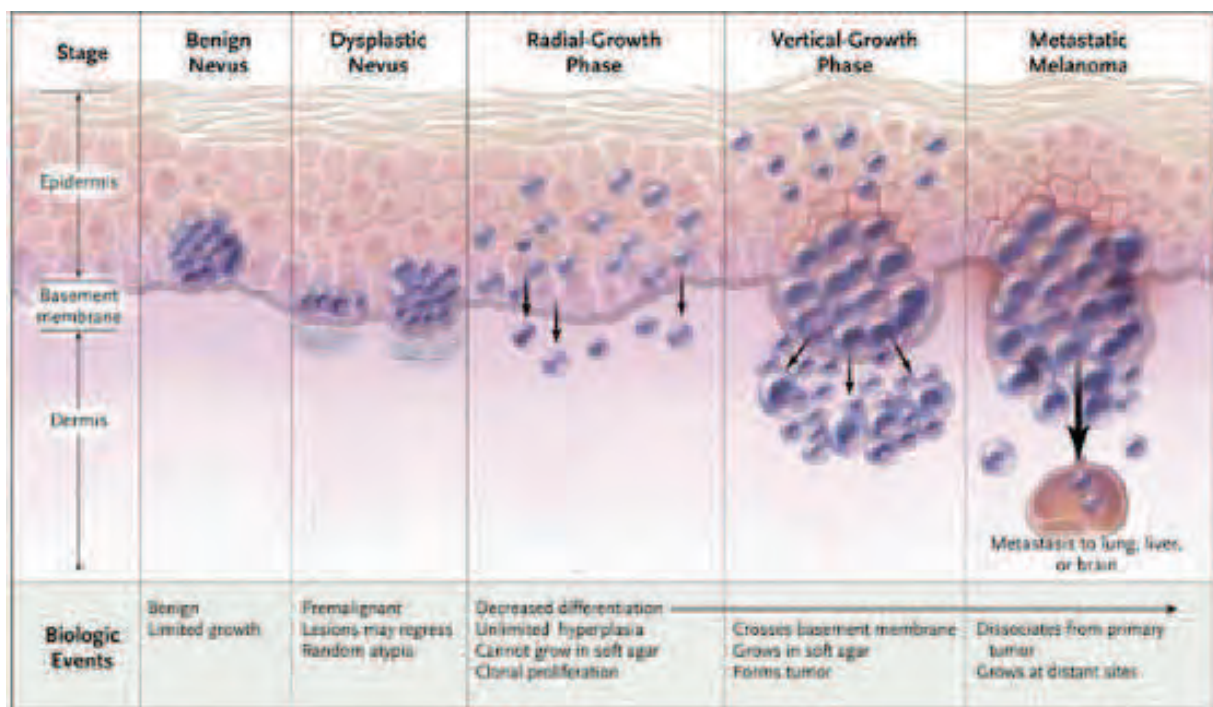
#### **2.4.2. Le développement pathologique des mélanocytes : transformation en mélanome**

##### **2.4.2.1. Bases cellulaires de l'oncogenèse du mélanome cutané**

La prolifération aberrante des mélanocytes va donner lieu à un nævus pouvant présenter différents degrés de dysplasie. Dans la majorité des cas, les cellules entreront en sénescence et celui-ci n'évoluera pas. Cependant, un nævus dysplasique peut commencer à s'étendre en superficie

(Figure 6) ; de même il arrive qu'un mélanocyte dysplasique donne directement une lésion sans former de nævus. L'évolution du mélanome peut être décomposée en plusieurs étapes successives selon un modèle décrit par Clark (pour revue (Miller and Mihm, 2006)) :

- la phase initiale d'extension est superficielle et reste épidermique, on parle de phase de croissance radiale (RGP pour Radial Growth Phase), ce stade est associé à un bon pronostic ;
- les cellules tumorales vont ensuite acquérir un potentiel invasif et entrer en phase de croissance verticale (VGP) au cours de laquelle elles vont traverser la membrane basale et envahir le derme. Le nouvel environnement alors apporté donne accès à la vascularisation et associe rapidement cette phase à l'acquisition d'un pouvoir métastatique ;
- la lésion évolue ensuite vers des formes plus agressives fortement invasives et vascularisées, le stade ultime étant la dissémination métastatique à distance pour envahir de nouveaux organes. Les métastases les plus fréquentes sont localisées sur la peau et dans les ganglions lymphatiques, puis, les poumons, le foie et le cerveau. Cependant, tous les organes peuvent être le siège de métastases d'un mélanome.



**Figure 6 - Modèle de progression linéaire du mélanome** (Miller and Mihm, 2006).

Le développement d'un mélanome à partir de mélanocytes sains et la progression de la maladie peuvent se décomposer en plusieurs étapes successives. La première phase correspond au développement d'un nævus bénin puis dysplasique, s'en suit une phase de croissance radiale (Radial Growth Phase) et une phase de croissance verticale (Vertical Growth Phase) avec une invasion du derme avant la dissémination métastatique.



Selon ce modèle classiquement admis, le mélanome se développerait à partir d'un mélanocyte mature ayant acquis des mutations génétiques lui accordant des avantages de survie et de croissance favorables à sa sélection naturelle et son expansion clonale. Ainsi, chaque cellule serait potentiellement tumorigène.

Cependant, seulement 26% des mélanomes observés en clinique proviennent de nævi, dont 43% de nævi dysplasiques. Cela signifie que la majorité des mélanomes surviennent sur une peau apparemment saine et leur développement ne suit pas le modèle linéaire décrit ci-dessus.

Il a été montré qu'une sous-population de cellules souches cancéreuses existait au sein de la tumeur et qu'elle était exclusivement responsable de la tumorigénicité (initiation, progression et hétérogénéité phénotypique de la tumeur). Ces cellules partageraient des caractéristiques communes avec les cellules souches somatiques comme la capacité d'auto-renouvellement et, tout comme les cellules souches normales sont nécessaires pour l'homéostasie tissulaire, les cellules souches cancéreuses seraient essentielles au maintien de la tumeur. Leur provenance n'est pas établie. Il a été proposé qu'elles dérivent de cellules souches ou progénitrices adultes. Elles pourraient également résulter de la transformation oncogénique de cellules différenciées ayant acquis des caractéristiques de cellules souches par réactivation de voies de signalisation permettant l'auto-renouvellement et la transformation maligne. Au vu de la divergence concernant la caractérisation des cellules souches cancéreuses, l'American Association for Cancer Research a décidé en 2006 d'unifier ce concept et d'attribuer la définition d'une cellule souche cancéreuse à une cellule présentant des capacités d'auto-renouvellement et étant à l'origine de l'hétérogénéité des cellules cancéreuses d'une masse tumorale (pour revue (Girouard and Murphy, 2011)) .

Un autre modèle de progression du mélanome propose un changement phénotypique des cellules en fonction des stimuli provenant de leur microenvironnement. Ainsi, selon ce modèle d'inter-conversion, une cellule tumorale rendue hypersensible aux stimuli extérieurs par des lésions génétiques serait capable de passer d'un état différencié à un état prolifératif ou encore invasif en réponse à des changements dans le microenvironnement tumoral (disponibilité en oxygène et nutriments, interactions avec les cellules de l'hôte, agents chimio-thérapeutiques...). Ce phénomène serait en partie régulé par le taux d'expression de la protéine MITF : une baisse de MITF permettrait de passer d'un état prolifératif à un état quiescent avec des propriétés invasives proches de celles des cellules souches alors qu'une augmentation de MITF dans une cellule quiescente activerait la division cellulaire et le passage à un état différencié prolifératif pour former une tumeur. De même, une augmentation de TGF- $\beta$  serait caractéristique du passage à un état invasif. Les voies Notch et  $\beta$ -

caténine joueraient aussi un rôle dans la régulation de ces changements phénotypiques (pour revue (Hoek and Goding, 2010)).

Toutefois, ces modèles ne sont pas nécessairement mutuellement exclusifs, et les éléments de chacun d'entre eux doivent jouer un rôle dans le développement du mélanome.

#### **2.4.2.2. Bases moléculaires de l'oncogenèse du mélanome cutané**

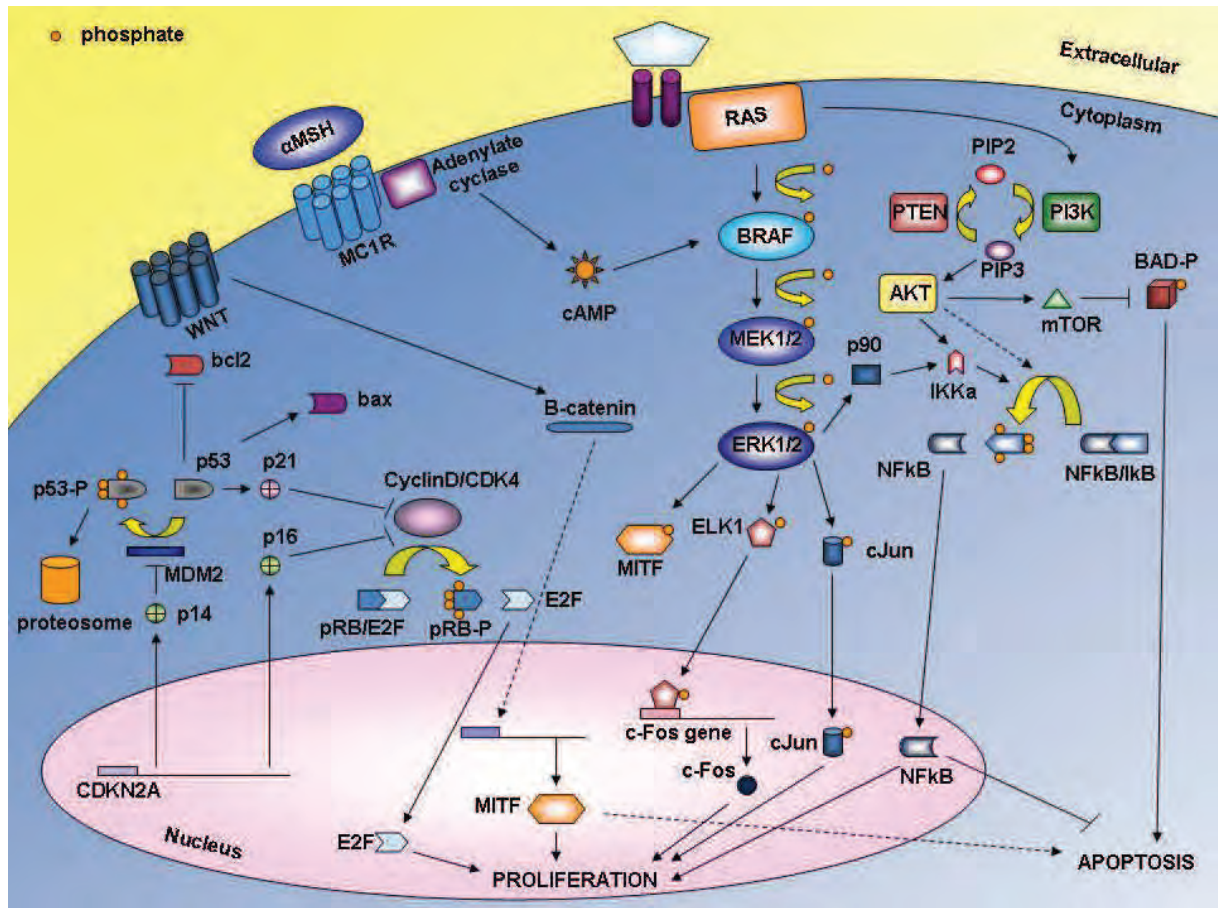
La transformation d'un mélanocyte en mélanome est associée à l'accumulation d'altérations géniques apportant un avantage sélectif favorable à l'expansion clonale. Ce phénomène implique l'activation d'oncogènes et l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeur. Il est associé à l'activation des voies de prolifération, et à l'inhibition des voies de sénescence et d'apoptose (Figure 7). Les stades d'invasion et de dissémination métastatique sont liés à des altérations de l'adhésion cellulaire. Les progrès dans les techniques de génétique moléculaire avec la génération de mutants transgéniques ont beaucoup apporté à la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu dans le développement et la progression du mélanome (cf chapitre I-2.5.2.3.).

##### **2.4.2.2.1. Voies de prolifération**

**La signalisation de Ras** est un réseau protéique complexe qui régule la croissance cellulaire, la survie, et l'invasion à travers deux cascades distinctes : celle des MAPKs et celle des PI3K. L'importance de la signalisation de Ras dans le mélanome est incontestable : plus de 90% des mélanomes et des néoplasmes mélanocytaires bénins sont porteurs de mutations activatrices pour l'un des deux gènes clés impliqués dans l'une ou l'autre de ces voies, à savoir *NRAS* ou *BRAF*. Bien que distinctes, de nombreuses interconnexions existent entre ces voies de signalisation intracellulaire (Figure 7).

Des mutations activatrices de la GTPase *NRAS* sont retrouvées dans 15 à 30% des mélanomes. Elles surviennent fréquemment dans les lésions nodulaires et les régions de la peau exposées au soleil, mais rarement dans les nævi dysplasiques. La mutation la plus commune est une substitution d'une glutamine en arginine en position 61 (Q61R). Cette forme oncogénique est capable d'induire un mélanome chez la souris déficiente en *Cdkn2a* (Ackermann *et al.*, 2005).

Les voies des MAPKs et PI3K-AKT peuvent être stimulées suite à l'activation de c-kit, tyrosine kinase jouant un rôle majeur dans le développement des mélanocytes. 20 à 25% des mélanomes acraux, muqueux, ou touchant la peau exposée au soleil de façon chronique présentent des mutations activatrices ou amplifications de *KIT*. La mutation la plus commune de *KIT* dans le mélanome est la substitution d'une leucine par une proline en position 576 (L576P) retrouvée dans environ un tiers des cas (Willmore-Payne *et al.*, 2005).



**Figure 7 - Principales voies de signalisation impliquées dans le mélanome (Palmieri *et al.*, 2009).**

Les voies de signalisation associées à NRAS, BRAF, et MAPK (mitogen-activated protein kinase) ainsi qu'à CDKN2A et MITF sont représentées schématiquement. Les flèches indiquent des signaux activateurs et les lignes interrompues des signaux inhibiteurs. BAD, BCL-2 antagonist of cell death; cAMP, cyclic AMP; CDK4, Cyclin-dependent kinase 4; CDKN2A, Cyclin dependent kinase inhibitor of kinase 2A; ERK1/2, Extracellular-related kinase 1 or 2; IκB, inhibitor of κB protein; IKK, inhibitor of κB-protein kinase; MC1R, melanocortin-1-receptor; MITF, Microphthalmia-Associated Transcription Factor; MEK1/2, Mitogen-activated protein kinase-extracellular related kinase 1/2; PI3K, Phosphatidylinositol 3 kinase; PIP2, Phosphatidylinositol bisphosphate; PIP3, Phosphatidylinositol trisphosphate; PTEN, Phosphatase and tensin homolog.

**La voie des MAPKs** - En plus des mutations affectant NRAS, cette voie peut être stimulée par des mutations du gène codant pour la sérine/thréonine kinase BRAF. En effet, des mutations activatrices de cette protéine ont été identifiées dans plus de 50% des mélanomes, la plupart liés à une exposition intermittente au soleil. La plus commune de ces mutations, comptant pour 90% de celles trouvées en clinique, est une mutation ponctuelle résultant en la substitution d'une valine en acide glutamique en position 600 (V600E). Ceci entraîne le maintien de la protéine sous sa conformation active indépendamment de RAS, conduisant à l'activation constitutive de la voie de signalisation des MAPKs via la phosphorylation de MEK, unique substrat connu de BRAF. L'expression exogène de BRAF<sup>V600E</sup> dans des mélanocytes induit leur prolifération avec formation d'un nævus (Pollock *et al.*, 2003; Yazdi *et al.*, 2003) mais d'autres événements oncogéniques sont nécessaires pour aboutir à leur transformation et au développement d'un mélanome (Dankort *et al.*, 2009; Michaloglou *et al.*, 2005; Patton *et al.*, 2005; Wellbrock *et al.*, 2004).

Les mutations de ces deux gènes, NRAS et BRAF, sont mutuellement exclusives (Pollock *et al.*, 2003; Tsao *et al.*, 2004 b) suggérant une redondance fonctionnelle entre ces événements.

**La voie PI3K/AKT** est activée soit par des mutations inactivatrices ou des délétions de PTEN, soit par des mutations activatrices de NRAS ou encore par surexpression d'AKT.

**PI3K** - L'expression de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) a été montrée comme étant plus élevée dans des mélanomes comparés à des nævi bénins (Aziz *et al.*, 2009), et plus particulièrement dans les spécimens métastatiques. De hauts niveaux d'expression corrèleraient avec une épaisseur de Breslow >2mm, l'absence de lymphocytes infiltrant la tumeur et un faible taux de survie. A l'échelle de l'ADN, les mutations activatrices de PI3K sont rares (~1% des mélanomes primaires) et aucune amplification n'a pu être démontrée. Par contre, au niveau protéique, PI3K est fréquemment surexprimée dans le mélanome.

**PTEN** - La phosphatase PTEN est un composant aval de la cascade de signalisation de PI3K et est fréquemment altérée dans le mélanome. En effet, ce suppresseur de tumeur est inactivé par mutation ou délétion dans 30 à 60% des cas et est considéré comme un des principaux médiateurs de la tumorigenèse du mélanome (Madhunapantula and Robertson, 2009). Son expression ectopique dans des lignées de mélanome empêche la formation de colonie en absence de support et ainsi que la formation de métastases *in vivo* (Hwang *et al.*, 2001).

La perte de PTEN et l'activation de NRAS étant fonctionnellement redondantes (*i.e.* activation de la voie PI3K), ces événements sont présents de façon mutuellement exclusives (Curtin *et al.*, 2005; Tsao *et al.*, 2000).

**AKT** - En promouvant la prolifération et la survie cellulaires, la kinase AKT joue un rôle clé dans le mélanome. Parmi les trois isoformes connues, AKT3 semble être celle qui est préférentiellement activée dans les mélanomes (Stahl *et al.*, 2004). Aucune mutation activatrice ni amplification n'a été décrite, c'est la perte de PTEN qui induirait son maintien sous sa forme phosphorylée active. Une fois activée, AKT possède plusieurs substrats enzymatiques, incluant Mdm2, procaspase 9, NF- $\kappa$ B, mTOR, et p27, la plupart contribuant à la prolifération et à la survie tumorale. AKT participe également à l'inhibition de l'apoptose (Madhunapantula and Robertson, 2009).

#### **2.4.2.2.2. Voies de sénescence**

La sénescence cellulaire est un arrêt de prolifération au niveau somatique, induit par un raccourcissement des télomères, une activation oncogénique, et/ou un stress cellulaire dû à des signaux intenses de prolifération (Di Micco *et al.*, 2006; Mooi and Peeper, 2006). Le locus *INK4A-ARF* apparaît comme central dans le contrôle de la sénescence cellulaire et correspond à un suppresseur de tumeur majeur muté dans de nombreux cancers et plus spécifiquement dans les mélanomes familiaux (cf chapitre I-2.3.) (Bennett and Medrano, 2002). D'autre part, l'expression et l'activité de la télomérase sont augmentées au cours de la progression du mélanome (Ramirez *et al.*, 1999). De même, l'augmentation d'expression de MITF dans le mélanome favoriserait la progression tumorale en empêchant l'entrée des cellules en sénescence (Giuliano *et al.*, 2010).

#### **2.4.2.2.3. Voies de l'apoptose**

L'apoptose est considérée comme étant le premier mécanisme par lequel les agents chimiothérapeutiques et les cytokines du système immunitaire (TNF, TRAIL, FasL) entraînent la mort des cellules tumorales (Igney and Krammer, 2002) ; les défauts dans ce processus représentent les mécanismes majeurs par lesquels les tumeurs fortement chimiorésistantes, tel le mélanome, se défendent des effets cytotoxiques d'un grand nombre d'agents chimiothérapeutiques. Ainsi, il a été montré que les défauts des cascades apoptotiques, tout comme la modulation aberrante par les voies de signalisation en amont telles que la voie PI3K/AKT/PTEN ou les voies de NF $\kappa$ B et Raf/MAPK, contribuaient à l'inhérente chimiorésistance observée dans le mélanome (pour revue (Soengas and Lowe, 2003)).

L'apoptose est activée en réponse à divers stimuli tels qu'une déprivation en facteurs de croissance, l'hypoxie, le détachement cellulaire, et les lésions de l'ADN (Igney and Krammer, 2002). Ces stimuli entraînent l'activation de membres pro-apoptotiques de la superfamille de Bcl-2, se traduisant par la perméabilisation de la membrane mitochondriale puis l'activation des caspases

effectrices pour aboutir à la mort cellulaire par apoptose. Les protéines responsables du maintien de l'intégrité génomique, comme la protéine p53, participent également à la régulation de ce processus.

**Les protéines de la famille de Bcl-2** - Dans le mélanome, on constate une surexpression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 et les XIAPs qui confèreraient une résistance à la chimiothérapie (Bush and Li, 2003; Tang *et al.*, 1998). L'expression de Bcl-2 est induite par le facteur de transcription du lignage mélanocytaire MITF. L'amplification de ce facteur de transcription a été identifiée dans ~15% des mélanomes. L'implication de Bcl-2 dans le mélanome est controversée : certains ont montré que des taux élevés de Bcl-2 étaient associés à une faible survie des patients atteints de mélanome métastatique alors que d'autres ont mis en évidence une diminution d'expression de cette protéine au cours de la progression de la pathologie (pour revue (Grossman and Altieri, 2001)). Bcl-2 ne jouerait donc pas un rôle essentiel dans la formation de mélanome mais contribuerait fortement à la survie des cellules mélaniques. Ceci est illustré par la dépigmentation et la perte des mélanocytes chez les souris déficientes en Bcl-2 (Yamamura *et al.*, 1996).

**La voie p53** - Contrairement à la majorité des cancers, le mélanome n'est pas associé à des mutations du gène *TP53*. En effet, ce suppresseur de tumeur n'est muté que dans ~5% des cas (Soussi *et al.*, 2005). Cependant, la fonction apoptotique de p53 est déficiente dans cette pathologie. Il a été suggéré que ce phénomène était lié à la perte de la protéine p14<sup>ARF</sup> qui interagit directement avec p53 pour empêcher la liaison avec MDM2 suivie de sa dégradation. Ainsi, l'absence de ARF, ajoutée dans certains cas à la surexpression de MDM2 (Muthusamy *et al.*, 2006), expliquerait le défaut d'apoptose dépendante de p53 dans le mélanome.

De plus, une étude a montré que le gène codant pour la protéine Apaf-1, médiateur de la cascade apoptotique induite par p53, était méthylé de façon aberrante dans le mélanome, entraînant ainsi sa perte et donc l'incapacité pour la cellule de répondre normalement aux signaux d'apoptose suite à l'activation de p53 (Soengas *et al.*, 2001).

#### **2.4.2.2.4. Voies de régulation de l'adhésion et de l'invasion cellulaires**

En conditions normales, l'adhésion cellulaire contrôle la migration des cellules, l'organisation tissulaire et l'organogenèse ; des perturbations de ce mécanisme contribuent à l'invasion, aux interactions tumeur-stroma, et à la signalisation des cellules tumorales.

**Les cadhérines** sont des protéines transmembranaires multifonctionnelles qui supportent les contacts cellule-cellule, forment des connexions avec le cytosquelette d'actine, et influencent la signalisation intracellulaire. Le domaine extracellulaire des cadhérines permet la liaison à des

cadhérines identiques sur les cellules alentour, formant ainsi les jonctions adhérentes. Les cadhérines sont divisées en trois sous-types : E (épithéliale), présente sur les kératinocytes et les mélanocytes de l'épiderme, P (placentaire), et N (neurale), retrouvée sur les cellules mésenchymateuses du derme. Leur domaine intracellulaire est associé à de nombreux complexes protéiques incluant  $\beta$ -caténine et forme des liens structuraux avec les faisceaux de filaments d'actine. Suite à l'activation de certaines voies de signalisation, notamment la voie WNT,  $\beta$ -caténine est dissociée du complexe d'adhésion cellulaire et transduit des signaux au noyau. Des mutations du gène  *$\beta$ -caténine* peuvent stabiliser cette protéine et/ou favoriser sa localisation nucléaire (Rubinfeld *et al.*, 1997), entraînant l'augmentation de l'expression de MITF (Widlund *et al.*, 2002) et CCND1 (cycline D1) (Shtutman *et al.*, 1999) qui, à leur tour, vont promouvoir la survie et la prolifération des cellules de mélanome. Des altérations de l'expression des cadhérines affectent l'interaction des cellules de mélanome avec leur microenvironnement et modifient la signalisation de  $\beta$ -caténine.

La E-cadhérine est exprimée par les mélanocytes et les kératinocytes, ce qui entraîne l'association de ces deux types cellulaires dans l'épiderme (Hsu *et al.*, 2000 b). A travers ces contacts, les kératinocytes de la couche basale inhibent la prolifération des mélanocytes qui deviennent alors dendritiques (Valyi-Nagy *et al.*, 1993). La progression de la phase radiale vers la phase verticale de croissance du mélanome est marquée par la perte de la E-cadhérine et l'acquisition d'expression de la N-cadhérine (Hsu *et al.*, 1996). La N-cadhérine est caractéristique des carcinomes invasifs et permet la dissémination métastatique en donnant la possibilité aux cellules de mélanome d'interagir avec d'autres cellules exprimant cette même molécule, telles que les fibroblastes dermiques et l'endothélium vasculaire (Hsu *et al.*, 2000 a). Au-delà de ces changements d'adhésion cellulaire, la perte d'expression de la E-cadhérine au profit d'une expression aberrante de la N-cadhérine augmente la survie des cellules de mélanome en stimulant la signalisation de la  $\beta$ -caténine (Li *et al.*, 2001 b).

**Les intégrines** assurent la médiation des contacts cellulaires avec les composants de la matrice extracellulaire, fibronectine, collagènes et laminine (pour revue (Kuphal *et al.*, 2005)). La transition de la phase radiale vers la phase verticale de croissance du mélanome est associée à l'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (Danen *et al.*, 1994). Cette intégrine induit l'expression de la métalloprotéase matricielle 2 (MMP2), enzyme qui dégrade le collagène dans la membrane basale (Brooks *et al.*, 1996; Felding-Habermann *et al.*, 2002). De plus, l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  augmente l'expression du gène de survie *BCL-2* (Petitclerc *et al.*, 1999) et stimule la motilité des cellules de mélanome à travers la réorganisation de leur cytosquelette d'actine (Li *et al.*, 2001 d).

La compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents au développement et à la progression du mélanome reste complexe du fait de l'interconnexion entre les différentes voies de signalisation. De plus, les altérations varient considérablement selon le type et l'origine du mélanome ainsi que le taux d'exposition solaire. D'autre part, de nombreux facteurs de croissance et cytokines régulent de façon autocrine et paracrine la croissance et le développement de la tumeur. Cet aspect sera abordé dans le chapitre II concernant le microenvironnement.

## **2.5. Les modèles d'étude du mélanome**

### **2.5.1. Les modèles *in vitro***

#### **2.5.1.1. La culture en deux-dimensions**

Les modèles de culture cellulaire en monocouche de cellules adhérentes fait partie intégrante de la recherche sur le cancer. On estime à plus de 5000 le nombre de lignées établies de mélanome et environ 200 lignées humaines ont été caractérisées pour leurs aberrations génétiques, leur profil d'expression génique et leurs propriétés biologiques telles que l'indépendance vis-à-vis des nutriments, la capacité de croissance en absence d'ancrage, l'invasion *in vitro* et la formation de tumeur et métastases chez la souris immunodéficiente. La large variété de lignées permet de recouvrir les différents stades possibles de progression du mélanome, allant de mélanocytes sains à des cellules tumorales fortement invasives et métastatiques. Généralement, les lignées sont établies directement à partir des tumeurs obtenues en clinique ou expérimentalement. Ces cultures représentent un outil précieux pour identifier des altérations moléculaires dans le mélanome. Une des approches consiste à isoler des cellules à la fois à partir de la tumeur primaire et de métastases chez un même patient (par exemple WM115 et WM266.4). Une autre alternative à l'injection de cellules humaines à des souris immunodéficientes a été l'isolement de cellules de mélanome murin, notamment la lignée B16, permettant d'analyser les paramètres mis en jeu dans un modèle syngénique.

Cependant, la croissance des cellules en monoculture expose les cellules à un environnement non comparable aux conditions *in vivo* et entraîne une pression de sélection pouvant entraîner la dérive des cellules.

#### **2.5.1.2. La culture en trois-dimensions**

Ces dernières années, l'importance du microenvironnement tumoral dans le développement et la progression du mélanome a été mise en avant. De multiples facteurs, au-delà des altérations géniques, sont impliqués dans l'évolution d'une cellule transformée. Ceux-ci incluent les nombreuses



interactions avec les autres types cellulaires (i.e. kératinocytes, fibroblastes et cellules immunes) (pour revue (Lee and Herlyn, 2007)). Afin de prendre en compte ces éléments, des modèles ont été développés. Les interactions entre plusieurs types cellulaires ont tout d'abord été abordées en co-culture traditionnelle 2D. Il a ainsi été montré que des kératinocytes indifférenciés avaient la capacité de contrôler la prolifération, la morphologie et la présentation antigénique de mélanocytes (Valyi-Nagy *et al.*, 1993). Toutefois, le développement de modèles plus avancés en 3D a permis de repousser les limites de la culture bi-dimensionnelle.

#### **2.5.1.2.1. Les sphéroïdes**

Le modèle des sphéroïdes tumoraux est une structure multicellulaire à trois dimensions qui présente une conformation proche de la tumeur *in vivo*. Lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions de non-adhérence (sur de l'agar/agarose par exemple), la plupart des cellules de mélanome vont former des structures globulaires ou sphères multicellulaires. Après une courte période d'incubation, ces structures vont ressembler à des tumeurs avasculaires, avec en périphérie des cellules accédant aux nutriments et à l'oxygène qui prolifèrent alors qu'au centre les cellules deviennent quiescentes et forment un noyau nécrotique. Le profil d'expression génique semble se rapprocher de celui trouvé *in vivo*, avec notamment sécrétion de facteurs pro-angiogéniques probablement stimulée par les conditions hypoxiques. Les sphéroïdes fournissent un modèle approprié pour l'étude de l'angiogenèse tumorale *in vitro*, avec possibilité de co-culture avec des cellules endothéliales. Une amélioration de ce modèle consiste à implanter les sphéroïdes dans du collagène afin de prendre en compte les interactions avec la matrice stromale. Ces modèles permettent d'aborder l'étude de l'invasion mais également la réponse vis-à-vis de différents agents chimiothérapeutiques.

#### **2.5.1.2.2. La peau reconstruite**

La culture de peau organotypique en 3D a permis de prendre en compte le microenvironnement de la peau humaine au sein d'une boîte de culture. Ce modèle consiste en un compartiment épidermique composé de kératinocytes seuls ou avec des mélanocytes (ou cellules de mélanome) déposé sur une matrice de fibroblastes dermiques primaires intégrés dans du collagène (Li *et al.*, 2011). Les cellules de mélanome alors introduites dans un tel système adoptent un profil reflétant la lésion dont elles proviennent. Des cellules issues d'un stade précoce de phase radiale de croissance (RGP) vont se développer dans l'épiderme en formant une membrane basale intacte sans capacité d'invasion du derme alors que des cellules provenant de phase verticale de croissance (VGP) ou de métastase vont envahir le derme en profondeur et la membrane basale sera diffuse. Ces

modèles représentent un outil de choix pour étudier les gènes et mécanismes moléculaires impliqués dans la progression du mélanome. Il a ainsi été montré que l'activation de TGF- $\beta$  entraîne l'invasion dermique de mélanocytes immortalisés présentant une activation de BRAF et sous-exprimant PTEN. De même pour des mélanocytes surexprimant RAS ou RAS/TGF- $\beta$  (Lo and Witte, 2008).

## **2.5.2. Les modèles *in vivo***

### **2.5.2.1. Les xénogreffes chez la souris immunodéficiente**

Afin d'évaluer l'impact de modifications génétiques ou de tester l'efficacité de différents traitements sur le développement de mélanome *in vivo*, les cellules ou prélèvements de patients peuvent être xéno-transplantés chez la souris immunodéficiente. Différentes approches peuvent être utilisées avec des injections sous-cutanées, orthotopiques, intraveineuses ou intracardiaques. Il existe plusieurs modèles de souris présentant des degrés d'immunodéficiences différents. Le premier modèle est basé sur la souris athymique *nude/nude* qui permet la croissance de tumeurs solides humaines. La souris CB17-*scid* supporte la transplantation de lignées de mélanome humain mais la croissance tumorale est limitée par les forts taux d'activité des cellules Natural Killer (NK). Ce problème est évité chez les souris NOD-*scid* déficientes en NK. Un modèle murin encore plus immunodéficient est la souche NOD-*scid Il2rg*<sup>-/-</sup> (aussi appelée NOG ou NSG) ayant incorporé une mutation de la chaîne- $\gamma$  du récepteur à l'interleukine-2. Ces animaux ne présentent pas d'activité cellulaire NK et sont déficients pour la fonction immunitaire innée, au moins vis-à-vis du mélanome ((Quintana *et al.*, 2008) et pour revue (Becker *et al.*, 2010)).

Ces modèles, bien que relativement simples à mettre en place, ne reflètent pas en totalité la pathologie humaine et ne prennent pas en compte l'importance du rôle de la réponse immune.

### **2.5.2.2. Les modèles syngéniques**

Les études visant à définir ou moduler les réponses immunes anti-tumorales nécessitent un système immunitaire intact et font appel à des transplantations syngéniques. Il existe plusieurs modèles de mélanome tels que les cellules Harding-Passey issues de souris BALB/c x DBA/2F1, Cloudman S91 de souris DBA/2 et B16 de souris C57BL/6. Ces mélanomes spontanés, le plus fréquemment utilisé étant probablement le B16, sont transplantables à des souris congéniques et peuvent aussi être cultivés, étudiés et manipulés *in vitro*. Ces modèles, très utiles, ont fortement contribué à la recherche sur la biologie du mélanome. Cependant, il faut noter que la peau chez la souris est différente de la peau humaine. En effet, tandis que les mélanocytes se localisent principalement à la jonction dermo-épidermique et dans les follicules pileux chez l'homme, chez la souris la plupart sont situés dans les follicules pileux, parfois dans le derme mais rarement à la

jonction dermo-épidermique. Ceci explique notamment que les souris ne soient pas enclines au développement de mélanome. En effet, aucun mutant murin spontané ou induit muté pour un des gènes clés du mélanome n'a été jusqu'à aujourd'hui isolé.

### **2.5.2.3. Les modèles transgéniques**

Le besoin d'élucider les différentes étapes conduisant à la formation de mélanome a mené à l'établissement de mutants. Ceci a été possible grâce aux techniques de génétique moléculaire incluant la transgénèse additionnelle classique (i.e. intégration d'une construction transgénique au hasard dans le génome) et la recombinaison homologue, permettant d'éliminer (knock-out), de remplacer (knock-in) ou de modifier (allèle conditionnel) un gène.

La plupart des modèles transgéniques ont été générés chez la souris, mais de nombreux travaux ont révélé l'utilité d'autres espèces comme le poisson, le rat ou le porc.

L'isolement du promoteur de la tyrosinase a été crucial pour exprimer les gènes d'intérêt spécifiquement dans le lignage mélanocytaire et des études récentes ont ajouté l'élément de régulation distal de la tyrosinase (DRE) pour améliorer l'expression transgénique dans les mélanocytes et la diminuer dans l'épithélium pigmentaire de la rétine. D'autres promoteurs de la famille des gènes de la tyrosinase ont été utilisés, comme *Tyrp1* (pour Tyrosinase-related protein 1) et *Dct* (pour dopachrome tautomerase).

#### **2.5.2.3.1. Les souris transgéniques**

Les premiers modèles de mélanome ont été générés par l'équipe de Beatrice Mintz avec des constructions permettant d'exprimer l'antigène grand T de SV40 sous le contrôle du promoteur de la tyrosinase murine (*Tyr::SV40Tag*) (Bradl *et al.*, 1991; Klein-Szanto *et al.*, 1991; Larue *et al.*, 1992). Une autre approche a utilisé le promoteur de la métallothionéine pour exprimer l'oncogène *Ret* (*MT::Ret*) (Iwamoto *et al.*, 1991).

Au cours des années 1990 et début des années 2000, de nombreux modèles transgéniques ont été développés (Tableau 2 - pour revue (Damsky and Bosenberg, 2010)) et la plupart d'entre eux ont employé l'expression de mutants de RAS ou l'activation de la voie de signalisation c-Met-HGF/SF spécifiquement dans les mélanocytes. Des modifications dans les éléments de contrôle du cycle cellulaire ont permis d'accentuer les effets en utilisant des fonds génétiques déficients pour *Cdkn2a* (p16 et/ou p19) et/ou présentant une activation de *Cdk4* (*Cdk4<sup>R24C</sup>*) de façon spécifique dans les mélanocytes. Selon les modèles, la formation de tumeur peut être dépendante de l'exposition à des agents carcinogènes.

Les avancées récentes dans la compréhension des altérations géniques dans le mélanome humain, en particulier les mutations activatrices de BRAF ainsi que l'activation de la voie PI3K/Akt/mTor via l'inactivation de PTEN, ont entraîné le développement de nouveaux modèles. De plus, les progrès de la technologie de recombinaison basée sur des systèmes inductibles (lox-Cre) permettent un contrôle spatio-temporel précis de l'expression des transgènes. Ainsi, un modèle basé sur l'activation de Braf (V600E) et l'inactivation de Pten dans les mélanocytes a été décrit (Dankort *et al.*, 2009). Dans ce modèle, 100% des animaux développent un mélanome métastatique et la formation tumorale peut être contrôlée de façon spatio-temporelle après application locale de 4-hydroxytamoxifène. Ce modèle présente de nombreux avantages parmi lesquels la faible latence et la reproductibilité de la cinétique de formation de la tumeur.

L'ensemble des modèles disponibles permet d'étudier la signalisation mise en jeu selon le génotype, la chimiosensibilité des tumeurs mais également d'évaluer et de mieux appréhender la fréquence et le mode d'apparition des métastases.

**Tableau 3 - Modèles murins de mélanome (actualisé à partir de (Damsky and Bosenberg, 2010)).**

Author (year)	PMID	Genetic modification	Background	Spontaneous Melanoma	Induced Melanoma	Metastasis	Cell lines ?	Notes
(Thang <i>et al.</i> , 2012)	22169325	MT::HL-RET		63.9%, mean latency 2.4 months		LN, Kidney, liver, spleen, lung		100% benign melanocytic proliferation ; Erk and Akt activated in malignant melanoma cells
(Jarrett <i>et al.</i> , 2012, p 201)	22699362	MT::HGF/SF	NM23+/-	no	UVR, 84% by 300 days	LN, lung, liver, bone	yes	NM23 is a potent metastasis suppressor
(Contassot <i>et al.</i> , 2012)	22128787	Tyr::N-RasQ61K			DMBA , 80% by 19 weeks	LN	yes	metastatic potential in xenografts
(Lindsay <i>et al.</i> , 2011)	22109529	Tyr::NRas <sup>Q61K/+</sup> ; Ink4a <sup>-/-</sup>	P-Rex1 ±	~71% by 200 days		skin, LN, lung	yes	P-rex is important for melanoblast migration and melanoma metastasis
(Sedlmaier <i>et al.</i> , 2011)	22014102	Tyr::HDGF	Ink4a±	no	no	no	not reported	increased epidermoid cysts after UVB radiation
(Choi <i>et al.</i> , 2011 b)	21896768	Thy1::mGluR5 <sup>WT</sup> ou S901A		80% penetrance by 7 months			not reported	foci melanoma on ears, nose and tail
		Trp1::mGluR5 <sup>WT</sup> ou S901A		~60% penetrance and 100% in progeny by 7 months			not reported	severe melanoma on ears, nose and tail
(Woods and Bishop, 2011)	20577802	Dct::rtTA tetO-cmyc			UVR, 10-17 month latency	not reported	not reported	works with lacZ/H2B-eGFP
(Shah <i>et al.</i> , 2010, p 201)	21203491	Tyr::cre <sup>ER</sup> ::NRas <sup>Q61K</sup> ::Ink4a <sup>-/-</sup> ::Atf2 <sup>ind</sup>		4% within 24-36 weeks		no		ATF2 downregulate MITF
(Nogueira <i>et al.</i> , 2010)	20711233	Tyr::H-RasV12G	Ink4a/ Arf - / - Pten ±	75%, med latency 18.9 weeks		rare LN, lung	yes	
(Ferguson <i>et al.</i> , 2010)	20718941	Tyr::N-RasQ61K	Cdk4 <sup>R24C/R24C</sup>	100% penetrance by ~300 days	UV accelerates/inc penetrance	not reported	not reported	nevus precursors?
		Tyr::N-RasQ61K	Arf - / -	~25% penetrance	UV accelerates/inc penetrance	not reported	not reported	
		Tyr::N-RasQ61K TyrCreERT2/p53 <sup>F/F</sup>		100% penetrance by 200 days	UV accelerates/inc penetrance	not reported	not reported	
(Yang <i>et al.</i> , 2010)	20530876	Tyr::H-RasV12G Tyr::rtTA tetO-Cre Ikkb <sup>F/F</sup>	Ink4a/ Arf - / -	4,6% pence, latency 79 days		not reported	not reported	IKKB loss inhibits tumorigenesis
(Monahan <i>et al.</i> , 2010)	20697345	Tyr::CreERT2/LSLK-ras <sup>G12D</sup> /p53 <sup>F/F</sup>		45%, 31 weeks med latency		none	yes	
		Tyr::CreERT2/LSLK-ras <sup>G12D</sup> /p16 <sup>F/F</sup>		73%, 24 weeks med latency		none	yes	
		Tyr::CreERT2/LSLK-ras <sup>G12D</sup> /p53 <sup>F/F</sup> , p16 <sup>F/F</sup>		100%, 9 weeks med latency		none	yes	
(Milagre <i>et al.</i> , 2010)	20516123	Tyr::CreERT2 LSK-ras <sup>G12D</sup>		100%, 4 months median latency		none	yes	metastatic potential in xenografts
(VanBrocklin <i>et al.</i> , 2010)	20444198	Dct::TVA Ink4a/Arf <sup>F/F</sup> (RCAS-NrasQ61R-IRES-Cre)		63% pence, med survival 47 days		none	yes	metastatic potential in xenografts
(Kumasaka <i>et al.</i> , 2010)	20048069	MT::Ret	Ednrb ±	about 40% by about 70 weeks		lung ~40%	not reported	inc mets rel to MT::RET
(Heidorn <i>et al.</i> , 2010)	20141835	Tyr::CreERT2 LSK-ras <sup>G12D</sup> LSL-Braf <sup>p594A</sup>		100% by 6 months		not reported	yes	no nevus precursors
(Held <i>et al.</i> , 2010)	20048081	Tyr::CreERT2 Pten <sup>F/F</sup> Cdkn2a <sup>F/F</sup>		100% by 40 weeks		not reported	yes (1118/1111)	tumor initiating sub-populations
(Chawla <i>et al.</i> , 2010)	20703083	Tyr::HrasG12V	Cdk4 <sup>R24C/R24C</sup>	33% by >15 months	enhanced by DMBA/TPA	no	not reported	
(Goel <i>et al.</i> , 2009)	19398955	Tyr::Braf <sup>v600E</sup>		<10% 295-595 med survival (2 founders)		LN	yes	melanocytic nevi
		Tyr::Braf <sup>v600E</sup>	Cdkn2a ±	11-38% penetrance, 185-485 days med latency		LN	yes	melanocytic nevi
		Tyr::Braf <sup>v600E</sup>	p53 ±	6-53% penetrance, 107-457 days med latency		LN	yes	melanocytic nevi

Author (year)	PMID	Genetic modification	Background	Spontaneous Melanoma	Induced Melanoma	Metastasis	Cell lines ?	Notes
(Dhomen <i>et al.</i> , 2009)	19345328	Tyr::CreERT2 LSL-Braf <sup>H600E</sup>		64%, med latency 12 months		no	yes	melanocytic nevi
		Tyr::CreERT2 LSL-Braf <sup>H600E</sup>	p16 <sup>-/-</sup>	80%, med latency 7 mos		no	yes	melanocytic nevi
(Dankort <i>et al.</i> , 2009)	19282848	Tyr::CreERT2 Braf <sup>CA/wt</sup> Pten <sup>F/F</sup>		100% within 10 weeks		100% lung/LN	yes (2697)	Rapamycin/MEK-I sensitive
(Inoue-Narita <i>et al.</i> , 2008)	18632629	Dct:Cre Pten <sup>F/F</sup>			DMBA/TPA: 50% by 25 weeks	20% lung	not reported	dec hair greying, neurologic phenotypes
(Delmas <i>et al.</i> , 2007)	18006687	Tyr::B-catenin <sup>sta</sup> Tyr::NRas <sup>Q61K</sup>		85%, 27.6 med latency		not reported	yes	congenic to C57BL/6
(Ha <i>et al.</i> , 2007)	17576930	MT::HGF/SF	p16 <sup>-/-</sup>		neonatal UVR, 100% by <450 days		melanocyte lines	
		MT::HGF/SF	p19 <sup>-/-</sup>		neonatal UVR, ~70% by 200 days	not reported	melanocyte lines	p53 independent function of Arf
(Yang <i>et al.</i> , 2007)	17575131	Xpc <sup>-/-</sup> Ink4a/Arf <sup>-/-</sup>		~70% by ~350 days	neonatal UVR	not reported	not reported	xpc <sup>-/-</sup> also has increased Ras mutants
(Huijbers <i>et al.</i> , 2006)	16540681	Tyr::creER-iRasP1A (HRasG12V) p16 <sup>F/F</sup> p19 <sup>F/F</sup>		33%, median 73-253 days (pig/non-pig)		no	yes	P1A antigen expression
(Tormo <i>et al.</i> , 2006)	16877364	MT::HGF/SF			DMBA/TPA, ~50% by 30 weeks	LN	not reported	congenic to C57BL/6
		MT::HGF/SF	Cdk4 <sup>R24C/R24C</sup>		DMBA/TPA, 100% by 12 weeks	LN	not reported	congenic to C57BL/6
(Hacker <i>et al.</i> , 2006)	16540642	Tyr::Hras <sup>G12V</sup>	Cdk4 <sup>R24C/R24C</sup>	58% in 1 year	UVR increases to 80% in 1 year	LN	yes	
(Yamazaki <i>et al.</i> , 2005)	16117793	K14::SCF XPA <sup>-/-</sup>			UVR, 55% by week 70	LN	not reported	
(Ackermann <i>et al.</i> , 2005)	15899789	Tyr::NRas <sup>Q61K</sup>		94% by 6 months				
		Tyr::NRas <sup>Q61K</sup>	p16 <sup>-/-</sup>	29%, median 12.5 months		LN, 36% lung/liver	yes	metastatic in NOD/SCID
(von Felbert <i>et al.</i> , 2005)	15743795	MT::Ret	IL6 <sup>-/-</sup>	47% by 65 weeks		cerebral	yes	IL6 <sup>-/-</sup> delays melanoma formation
(Hacker <i>et al.</i> , 2005)	16297212	Tyr::HRas <sup>G12V</sup>			UVR, 57% by 12 months	not reported	yes	
(Sharpless <i>et al.</i> , 2003)	12902988	Tyr::HRas <sup>G12V</sup>	p19 <sup>-/-</sup>	52% by 81 weeks		not reported	not reported	
		Tyr::HRas <sup>G12V</sup>	p16 <sup>-/-</sup>	35% by 89 weeks		not reported	not reported	
(Pollock <i>et al.</i> , 2003)	12704387	Dct::Grm1		100%, up to 20 months		LN	not reported	hyperpigmented precursors
(Kannan <i>et al.</i> , 2003)	12538879	Tyr::HRas <sup>G12V</sup>	p19 <sup>-/-</sup>	~50% by 50 weeks	>75% by 50 weeks	not reported	not reported	UV induces Cdk6 amplification
		Tyr::HRas <sup>G12V</sup>	p16 <sup>-/-</sup>	~50% by 50 weeks	~50% by 50 weeks	not reported	not reported	
(Recio <i>et al.</i> , 2002)	12438273	MT::HGF/SF	p16 <sup>-/-</sup> p19 <sup>-/-</sup>		100% by 50 days	LN, liver	not reported	
(Yang <i>et al.</i> , 2001)	11719444	Tyr::MIP-2	p16± p19±	18.5% through 40 weeks	DMBA, 12% 198 days	none	yes	metastatic in nude mice
(Kligman and Elenitsas, 2001)	11479419	Skh-hr-2		8% through 30-47 weeks	DMBA	LN, lung	not reported	pigmented macules in other mice
(Bardeesy <i>et al.</i> , 2001)	11238948	Tyr::Hras <sup>G12V</sup>	p53 <sup>-/-</sup>	26%, med latency 17 weeks		no	yes	
(Krimpenfort <i>et al.</i> , 2001)	11544530		p16 <sup>-/-</sup> p19±		DMBA, 50% between 3 and 9 months	LN, lung, liver, spleen	not reported	
(Sotillo <i>et al.</i> , 2001)	11606789		Cdk4 <sup>R24C/R24C</sup>		DMBA/TPA, 70% by 25 weeks	no	not reported	
(Noonan <i>et al.</i> , 2001)	11565020		MT::HGF/SF		UVR, ~20-40% by 450 days	not reported	not reported	neonatal UVR important for tumorigenesis
(Strickland <i>et al.</i> , 2000)	10989613				aloe emodin/UVR, 50-70% by 30 weeks	not reported	not reported	B3H congenic
(Noonan <i>et al.</i> , 2000)	10919643		MT::HGF/SF		UVR, >50% by 21 months	not reported	not reported	
(Kato <i>et al.</i> , 2000)	11121157		MT::Ret		UVR, 80% by 28 weeks	lung up to 50%	not reported	UV super-activates Ret
(Chin <i>et al.</i> , 1999)	10440378	Tyr::rtTA tetO::HRas <sup>G12V</sup>	Cdkn2a <sup>-/-</sup>	25%, median latency 60 days		not reported	yes	KrasG12V addiction
(Broome Powell <i>et al.</i> , 1999)	10469620		Tyr::HRas <sup>G12V</sup>		UVR, DMBA, TPA, combinations, variable	some lung, LN	yes	also melanocytic nevus development
(Kunisada <i>et al.</i> , 1998)	9584135		K14::SCF	no	no	no	no	epidermal retention of melanocytes
(Otsuka <i>et al.</i> , 1998)	9823327		MT::HGF/SF	22%, mean latency 15.6 months		LN, liver, spleen	yes	

Author (year)	PMID	Genetic modification	Background	Spontaneous Melanoma	Induced Melanoma	Metastasis	Cell lines ?	Notes
(Kato <i>et al.</i> , 1998)	9778055	MT::Ret		65% malignant, mean latency 130 days		LN, lung, brain, others	yes	100% benign melanocytic proliferation
(Zhu <i>et al.</i> , 1998)	9506443	TG3		100% penetrance		LN, lung, brain, others	not reported	unknown transgene insertion site
(Kelsall and Mintz, 1998)	3751610	Tyr::SV40E			UVR 12.5%, mean latency 77 weeks	LN, lung, kidney	not reported	
(Chin <i>et al.</i> , 1997)	9353252	Tyr::HRas <sup>G12V</sup>	Cdkn2a <sup>-/-</sup>	60% penetrance by 6 months		no	yes	
(Chen <i>et al.</i> , 1996)	8618055	TG3		100% penetrance		not reported	not reported	unknown transgene insertion site
(Powell <i>et al.</i> , 1995)	7662120	Tyr::HRas <sup>G12V</sup>		no	no	no	not reported	melanocytic hyperplasia
(Klein-Szanto <i>et al.</i> , 1994)	8062242	Tyr::SV40E			UVR, early lesions transplanted at 20 weeks	indirectly (LN, lung)	not reported	
(Mintz and Silvers, 1993)	8415613	Tyr::SV40E		25-100%, average 46-51 weeks		indirectly (LN, lung)	not reported	early eye melanomas, must transplant
(Husain <i>et al.</i> , 1991)	1909931	Skh-hr-2			DMBA/UVR, 25-33% by 20-30 weeks	no	not reported	
(Bradl <i>et al.</i> , 1991, p 199)	1846036	Tyr::SV40E		<10% cutaneous melanoma		not reported	not reported	
(Klein-Szanto <i>et al.</i> , 1991)	1846037	Tyr::SV40E		17% cutaneous melanoma		no	not reported	melanosis, ocular lesions
(Iwamoto <i>et al.</i> , 1991)	1915289	MT::Ret		variable depending on founder		not reported	yes	melanosis, ocular lesions
(Romerdahl <i>et al.</i> , 1989)	2517915				UVR/DMBA/croton oil, >31% penetrance	?	?	C3H congenic
(Takizawa <i>et al.</i> , 1985)	3924435				DMBA/croton oil, 0-80% depending on strain	not reported	not reported	DBA resistant to macule/melanoma
(Holman <i>et al.</i> , 1983)	6578359	?						
(Berkelhammer <i>et al.</i> , 1982)	7093959				DMBA/croton oil, 10% penetrance	after transplantation	yes	
(Epstein <i>et al.</i> , 1967)	6016644			?	DMBA/UVR	?	?	
(Green, 1962)	n/a			spontaneous			yes	B16 melanoma
(Cloudman, 1941)	n/a			spontaneous			yes	Cloudman melanoma
(Harding and Passey, 1930)	n/a			spontaneous			yes	Harding-Passey melanoma

### 2.5.2.3.2. Les poissons-zèbres transgéniques

Le poisson-zèbre est un autre système modèle établi pour le mélanome. Il développe rarement des cancers spontanés mais a la capacité de développer des tumeurs dans quasiment tous les tissus après traitement par des carcinogènes. Son génome est parfaitement connu et plusieurs gènes impliqués dans les cancers humains sont conservés. Cet organisme présente de nombreux avantages car il est peu coûteux, nécessite peu de soin et produit une nombreuse progéniture. Les embryons présentent l'avantage d'être transparents jusqu'à un mois, offrant de grandes possibilités d'imagerie sur l'organisme en cours de développement et la pigmentation des mélanocytes est visible au microscope. Ce modèle permet également de générer des animaux transgéniques, avec possibilité de suivre le gène dans les contextes de développement à la fois embryonnaire et cancéreux.

Une étude récente s'intéressant aux effets de la surexpression de la forme humaine BRAF<sup>V600E</sup> dans les mélanocytes du poisson-zèbre a montré que cette mutation s'accompagnait de la formation de lésions de type nævi ; par contre lorsqu'elle est croisée avec une souche déficiente pour p53 ceci se traduit par la formation de mélanomes fortement invasifs (Patton *et al.*, 2005). De même, l'expression d'une forme mutée de NRAS (NRAS<sup>Q61K</sup>) entraîne des défauts de pigmentation et forme des mélanomes sur un fond déficient pour p53 (Dovey *et al.*, 2009).

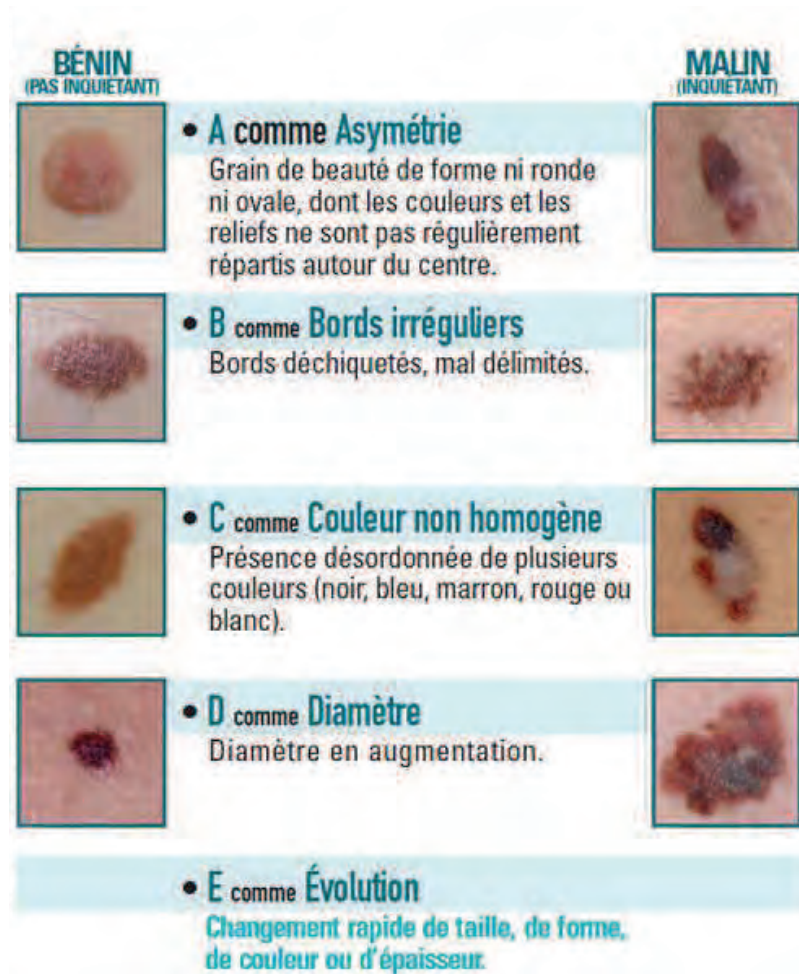
## 2.6. Le diagnostic du mélanome cutané

Le diagnostic vise à identifier toute lésion cutanée pouvant faire évoquer un mélanome ou être susceptible d'évoluer vers un mélanome, en prenant en compte les facteurs de risque du patient. L'intérêt d'un diagnostic précoce est d'identifier un mélanome le plus tôt possible par rapport à sa phase d'évolution, lorsqu'il est peu épais (indice de Breslow < 1 mm) et dans l'idéal encore au stade de mélanome *in situ* (phase intra-épidermique). Il est réalisé par un examen clinique de la peau et une analyse anatomo-pathologique permet de le confirmer. Les éléments pris en compte sont le nombre et la forme des lésions mélanocytaires, leur disposition, leur topographie, leur distribution et leur étendue.

Une lésion susceptible d'être un mélanome est (Figure 8):

- une lésion asymétrique (critère A) ;
- dont les bords peuvent être irréguliers, encochés, polycycliques ou nettement délimités par rapport à la peau environnante (critère B) ;
- de couleur non homogène, allant du brun clair au noir foncé (critère C) ;
- de diamètre > 6 mm (critère D) ;
- évolutive dans sa taille (la lésion s'élargit), sa couleur ou son épaisseur (critère E).





**Figure 8 - Critères de la règle ABCDE de reconnaissance de signes de mélanome.**  
(<http://www.inpes.sante.fr/30000/actus2012/013-UV-peau-retine.asp>)

Cette règle "abécédaire" est utilisée de manière consensuelle par les dermatologues.

La dermoscopie, ou microscopie en épiluminescence, complète l'examen clinique des lésions pigmentaires. Cette technique médicale permet l'observation des structures pigmentaires internes de l'épiderme, de la jonction dermoépidermique et des premières couches du derme. Sa sensibilité et sa spécificité permettent d'augmenter significativement la performance du diagnostic de mélanome par rapport à l'examen clinique à l'œil nu.

Toute lésion suspecte justifie une exérèse complète allant jusqu'à l'hypoderme avec une marge de sécurité pour subir un examen anatomo-pathologique, test de confirmation du diagnostic de mélanome apportant les éléments pronostiques indispensables au clinicien. Il permet de préciser l'épaisseur maximum en mm (indice de Breslow), l'état des marges d'exérèse, le niveau d'invasion (indice de Clark), l'existence ou non d'une zone de régression, l'existence ou non d'une ulcération et l'index mitotique. Depuis la septième édition de l'"American joint committee on cancer" (AJCC) entrée en vigueur au 1<sup>er</sup> janvier 2010, la classification des mélanomes a été réévaluée et de nouveaux

facteurs pronostiques ont été introduits dans la classification TNM (Tableau 3). Celle-ci, utilisée pour la plupart des tumeurs solides, considère la taille tumorale et le degré d'invasion locale (T) ; le nombre, la taille et la localisation des ganglions lymphatiques (N) et la présence de métastases à distance (M). Ce système prend aussi en compte l'épaisseur de la tumeur primaire (indice de Breslow) et le degré d'invasivité en profondeur (indice de Clark).

En pratique, le diagnostic de mélanome repose toujours sur l'analyse morphologique de la tumeur primaire et la prise en charge thérapeutique est dictée par l'épaisseur tumorale.

**Tableau 3 - Catégorie TNM pour la classification du mélanome cutané** (American joint committee on cancer – AJCC, 7<sup>e</sup> édition, valable dès 1.1.2010 - (Balch et al. 2009)).

Classification	Epaisseur (mm)	Ulcération/mitoses
<b>T</b>		
<b>Tis</b>	Mélanome in situ	NA
<b>T1</b>	≤ 1	A: sans ulcération et mitoses < 1/mm <sup>2</sup> B: avec ulcération ou mitoses ≥ 1/mm <sup>2</sup>
<b>T2</b>	1,01-2	A: sans ulcération B: avec ulcération
<b>T3</b>	2,01-4	A: sans ulcération B: avec ulcération
<b>T4</b>	> 4	A: sans ulcération B: avec ulcération
<b>N</b>	Nombre de ganglions métastatiques	Charge métastatique ganglionnaire
<b>N0</b>	0	NA
<b>N1</b>	1	A: micrométastase* B: macrométastase**
<b>N2</b>	2-3	A: micrométastase* B: macrométastase** C: métastases en transit ou satellites sans ganglions métastatiques
<b>N3</b>	≥ 4 ganglions lymphatiques métastatiques ou métastases en transit ou satellites avec ganglions lymphatiques métastatiques	
<b>M</b>	Site	LDH sérique
<b>M0</b>	Pas de métastase à distance	NA
<b>M1a</b>	Métastases à distance de la peau, du tissu sous-cutané ou d'un ganglion	Normal
<b>M1b</b>	Métastases pulmonaires	Normal
<b>M1c</b>	+ Toute autre métastase viscérale + Toutes métastases à distance	Normal Elevé

NA: non applicable; LDH: lactate déshydrogénase; TNM: tumor, node, metastase.  
\* Les micrométastases sont diagnostiquées avec la technique du ganglion sentinelle.  
\*\* Les macrométastases sont définies comme ganglions métastatiques cliniquement décelables et confirmés histologiquement.

## 2.7. Les traitements du mélanome cutané

Les options thérapeutiques sont définies notamment en fonction de la localisation de la tumeur, du stade, de l'histologie et de l'état général du patient. Lorsqu'il s'agit d'une forme localisée non métastatique, l'exérèse chirurgicale est le traitement de référence du mélanome cutané et est souvent le seul traitement nécessaire. Dans certains cas, en fonction du stade d'avancement du mélanome et des risques individuels, un traitement adjuvant est préconisé après la chirurgie afin de prévenir une éventuelle rechute.

Le stade des mélanomes au moment du diagnostic est exprimé par un chiffre romain allant de I à IV.

- Le stade I désigne les mélanomes localisés de faible épaisseur ou non ulcérés. Les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints. Il n'y a ni métastase « en transit », ni métastase à distance.
- Le stade II désigne les mélanomes localisés de plus grande épaisseur ou avec ulcération. Les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints. Il n'y a ni métastase « en transit », ni métastase à distance.
- Le stade III désigne les mélanomes qui, quelle que soit leur épaisseur, présentent un envahissement locorégional : atteinte des ganglions lymphatiques ou présence de métastases « en transit ».
- Le stade IV désigne les mélanomes qui, quelle que soit leur épaisseur et l'atteinte ganglionnaire, présentent des métastases à distance. On parle aussi de mélanome métastatique.

La connaissance du stade du mélanome au moment du diagnostic est déterminante pour adapter la prise en charge thérapeutique.

### 2.7.1. Traitements des mélanomes locaux et régionaux (stades I, II et III)

#### 2.7.1.1. Chirurgie

Les différents types de chirurgie pour un mélanome local ou régional sont :

- L'exérèse élargie : le premier traitement du mélanome est la résection chirurgicale de la tumeur cutanée primaire. L'étendue de l'exérèse dépend de l'épaisseur du mélanome. La plupart des mélanomes sont détectés à des stades précoces <1mm, lorsque seule la chirurgie est nécessaire. La tumeur est retirée dans sa totalité en respectant les marges d'exérèse préconisées en fonction de l'épaisseur d'infiltration tumorale. Pour un mélanome *in situ* (stade 0), les marges seront de 0,5 à 1 cm ; celles-ci augmentent en fonction de l'indice de Breslow, allant de 1 cm pour un mélanome de 1

mm, à 2 cm pour un mélanome de 2 à 4 mm d'épaisseur et jusqu'à 3 cm au-delà. En fonction de l'étendue, une greffe de peau peut être nécessaire.

- L'exérèse du ganglion sentinelle : la technique du ganglion sentinelle consiste à retirer le ganglion situé le plus proche du mélanome afin de vérifier s'il contient ou non des micrométastases. En renseignant sur l'envahissement ou non des ganglions, cette procédure permet de préciser le stade du cancer, ce qui est indispensable pour décider d'un éventuel traitement complémentaire à la chirurgie. L'atteinte du ganglion analysé donne une indication pronostique. Le risque de récurrence du mélanome est en effet plus important pour les patients dont le ganglion sentinelle est atteint que chez ceux dont le ganglion sentinelle est indemne. Cette démarche est souvent utilisée pour des patients présentant une tumeur supérieure à 1 mm d'épaisseur ; le risque d'atteinte ganglionnaire pour des mélanomes inférieurs à 1 mm étant très faible, l'analyse du ganglion sentinelle n'est pas nécessaire pour ces cas-là, à moins qu'ils ne présentent des indices d'agressivité tels une ulcération ou un fort index mitotique.

- L'évidement ganglionnaire total : lorsque l'analyse du ganglion sentinelle s'avère positive avec présence de micrométastases de mélanome, il est recommandé de retirer l'ensemble des ganglions lymphatiques qui drainent la zone de la tumeur.

#### **2.7.1.2. Thérapie adjuvante pour les stades II et III**

Après la chirurgie, un traitement adjuvant sera recommandé pour les patients présentant un haut risque de récurrence afin de le diminuer. Cela concerne les patients avec un mélanome d'épaisseur supérieure à 4 mm (stade IIB) ou ayant atteint les ganglions régionaux (stade III). Les possibilités de traitement comprennent l'immunothérapie, la radiothérapie ou la participation à des essais cliniques qui offrent de nouvelles possibilités thérapeutiques.

- **Immunothérapie**

L'immunothérapie vise à stimuler les défenses immunitaires de l'organisme contre les cellules cancéreuses. Le médicament utilisé dans le traitement du mélanome est l'interféron alpha-2b à forte dose. Il a été montré que ce traitement réduisait considérablement les risques de rechute et, dans certains cas, augmentait la survie globale malgré des effets secondaires importants (fièvre, nausées, fatigue, dépression...).

Dans le cas de mélanomes de stade III ne pouvant être excisés chirurgicalement, la Food and Drug Administration (FDA) a ainsi approuvé le traitement par Ipilimumab, anti-CTLA-4. Ce traitement est abordé dans le chapitre 1.2.7.2. concernant l'immunothérapie pour les mélanomes de stade IV.

Des essais cliniques avec l'interféron sont actuellement en cours afin d'évaluer le bénéfice de faibles doses d'interféron ainsi qu'une durée plus courte ou d'autres formulations comme des formes pégylées d'interféron. De plus, des essais cliniques avec des approches vaccinales ou d'autres anticorps anti-CTLA4 sont en cours d'évaluation pour le traitement de mélanomes de stades II et III. Des vaccins qui amélioreraient la résistance immunitaire spécifique du mélanome ont fait l'objet de nombreux essais et sont actuellement testés comme thérapie adjuvante pour le mélanome.

- **Thérapie ciblée**

La thérapie ciblée est un traitement visant des gènes, protéines ou environnement tissulaire spécifiques du cancer et contribuant à sa croissance et sa survie. En 2011, la FDA a approuvé une thérapie ciblée appelée Vemurafenib pour les patients atteints de mélanome de stade III ne pouvant être retiré chirurgicalement ou de stade IV et portant la mutation génétique pour BRAF (V600E). Ce traitement sera abordé dans le chapitre I.2.7.2. concernant la thérapie ciblée des mélanomes de stade IV.

- **Radiothérapie**

De façon générale, la radiothérapie est peu utilisée dans le traitement du mélanome. Elle est proposée essentiellement dans les localisations cérébrales et osseuses et a pour objectif de soulager les douleurs et d'améliorer la qualité de vie dans un but palliatif.

- **Chimiothérapie locorégionale**

La chimiothérapie est l'utilisation de drogues pour tuer les cellules cancéreuses généralement en agissant sur leurs mécanismes de croissance et de division. Pour un mélanome de stade III disséminé sur un seul membre (tumeur primaire sur un bras ou une jambe avec des métastases satellites ou en-transit) une perfusion de chimiothérapie sur membre isolé peut être utilisée. La circulation sanguine du membre est dérivée de manière à l'isoler du reste du corps et à interrompre la communication du sang avec le reste du corps. De fortes doses de chimiothérapie (Melphalan avec ou sans TNF $\alpha$ ) sont ensuite administrées dans la circulation isolée. Cette méthode est réalisée dans des conditions d'hyperthermie, la température du sang circulant dans le membre étant comprise entre 38° et 40°. Cela permet une circulation optimale dans la tumeur et ainsi une bonne pénétration des médicaments. Ces traitements apportent un bénéfice palliatif mais ne modifient pas la survie globale des patients.

## 2.7.2. Traitements des mélanomes avec métastases à distance (stade IV)

Un mélanome ayant métastasé ou disséminé au-delà des ganglions drainant la tumeur est considéré de stade IV. Les sites de dissémination les plus communs au delà de la peau sont les poumons, le foie et le cerveau. A ce stade là, actuellement, il est difficile de l'éliminer car il n'existe aucun traitement efficace et les cliniciens font face à un réel échec thérapeutique. Il faut cependant noter qu'apparaissent de nombreuses nouvelles approches prometteuses pour le traitement de mélanome métastatique, notamment de nouvelles thérapies ciblées et immunothérapies. La participation à un essai clinique reste l'option de préférence pour les patients avec un mélanome de stade IV. Au-delà de prolonger la durée de survie, les traitements anticancéreux visent à soulager les symptômes et effets secondaires et à améliorer la qualité de vie des patients dans une approche palliative. Les recommandations de traitement pour les patients avec un mélanome métastatique dépendent de plusieurs facteurs, incluant l'âge et l'état de santé globale, le nombre et la localisation des métastases, la vitesse de dissémination et les souhaits du patient pour le traitement. Les différentes options sont la chimiothérapie, l'immunothérapie, la combinaison des deux appelée biochimiothérapie, la thérapie ciblée, la radiothérapie, la chirurgie pour les métastases limitées et/ou isolées et la participation à un essai clinique.

- **Chimiothérapie**

La chimiothérapie consiste à administrer un ou une combinaison d'agent(s) anticancéreux en plusieurs cycles répartis dans un temps défini. Seule la **Dacarbazine** (DTIC, Déticène®), un agent alkylant, est approuvée par la FDA comme chimiothérapie systémique pour le mélanome. Le **Témazolomide** (Témodal®) correspond à la version orale du DTIC et est fréquemment utilisé pour le traitement de mélanome de stade IV. Le taux de réponse à ces agents sur le long terme est très faible et ne concerne que 1 à 2% des patients. Les autres agents chimiothérapeutiques utilisés dans le traitement du mélanome sont le Cisplatine (Platinol®), les Taxanes (groupe de médicaments incluant le Paclitaxel [Taxol®] et le Docetaxel [Taxotere®]), la Carmustine (BiCNU), la Fotémustine (Muphoran®), la lomustine (CeeNU) et la Vinblastine (Velban®, Velsar®). Des combinaisons d'agents chimiothérapeutiques, comme Paclitaxel et Carboplatine, peuvent aussi être données à des patients avec un mélanome de stade IV. Des combinaisons de nouvelles drogues qui permettraient de réduire la résistance du mélanome à la chimiothérapie sont en cours d'étude. Les effets secondaires dépendent des individus et des doses utilisées mais ils peuvent inclure fatigue, risque d'infection, nausées et vomissements, perte d'appétit, diarrhée, troubles neurologiques entraînant des changements de sensations et perte de cheveux. Ces effets secondaires disparaissent généralement à la fin du traitement.

- **Immunothérapie**

**L'interleukine-2 (IL-2)** (Proleukin®) active fortement les lymphocytes T et est utilisée pour les patients avec un mélanome de stade avancé. Le traitement actuellement approuvé par la FDA consiste en deux séances de 5 jours d'administration d'IL-2 espacées d'une période de repos de 7 à 10 jours. Les principaux effets secondaires sont une hypotension, de la fièvre, des frissons, le syndrome de "fuite capillaire" lorsque les fluides et protéines fuient des vaisseaux sanguins, ce qui peut entraîner une hypotension et d'autres effets dangereux. Le traitement par de fortes doses d'IL-2 requiert une surveillance intense des patients. Les taux de réponse objective à ce traitement sont compris entre 10 et 20% et environ 4 à 6% des patients obtiendraient une rémission totale. Une étude a montré qu'un transfert adoptif de cellules, qui consiste à isoler des lymphocytes dérivés de la tumeur, les activer *ex vivo* en culture par l'IL-2 et les réinjecter de façon autologue avec de fortes doses d'IL-2 améliorerait durablement la réponse (Dudley *et al.*, 2008). D'autres données récentes ont montré que les effets de l'IL-2 étaient potentialisés par un vaccin peptidique gp100 chez des patients présentant des mélanomes de stade III ou IV localement avancés (Schwartzentruber *et al.*, 2011).

**L'Ipilimumab** (Yervoy®) est une autre immunothérapie approuvée par la FDA en mars 2011 pour le traitement de mélanomes métastatiques de stade III et IV non résecables comme premier traitement ou suite à d'autres thérapies. Il s'agit du premier des deux médicaments approuvés en 2011 ayant montré un bénéfice de survie pour de tels patients (le second étant le Vémurafenib décrit plus loin) (Hodi *et al.*, 2010; Robert *et al.*, 2011). L'Ipilimumab est un anticorps monoclonal qui bloque l'activité de l'antigène 4 des lymphocytes-T cytotoxiques (CTLA-4), empêchant l'action inhibitrice de cet antigène sur l'activation des lymphocytes-T, ravivant ainsi la réponse immune anti-tumorale. Le taux de réponse objective est de 7 à 10%. Les effets secondaires observés sont liés à une réponse auto-immune et se traduisent principalement aux niveaux digestif (diarrhée ou colite) ou cutanés (rash, prurit). D'autres anticorps anti-CTLA4 sont actuellement en développement clinique comme le Tremelimumab.

- **Les thérapies ciblées** (Figure 9)

#### Les inhibiteurs de c-kit

Après l'identification de mutations de *KIT* dans le mélanome, des études de phase II ont évalué l'efficacité de l'**imatinib**, un inhibiteur de tyrosine kinase qui cible BCR-ABL, c-Kit et PDGFR- $\alpha$  et - $\beta$ , dans un contexte de mélanome métastatique muté pour KIT. Ces études ont confirmé la pertinence de supprimer c-KIT mais la validation des effets nécessite des essais de phase III. D'autres inhibiteurs de c-Kit sont actuellement en cours d'étude (Tableau 4). Une réponse significative à un autre

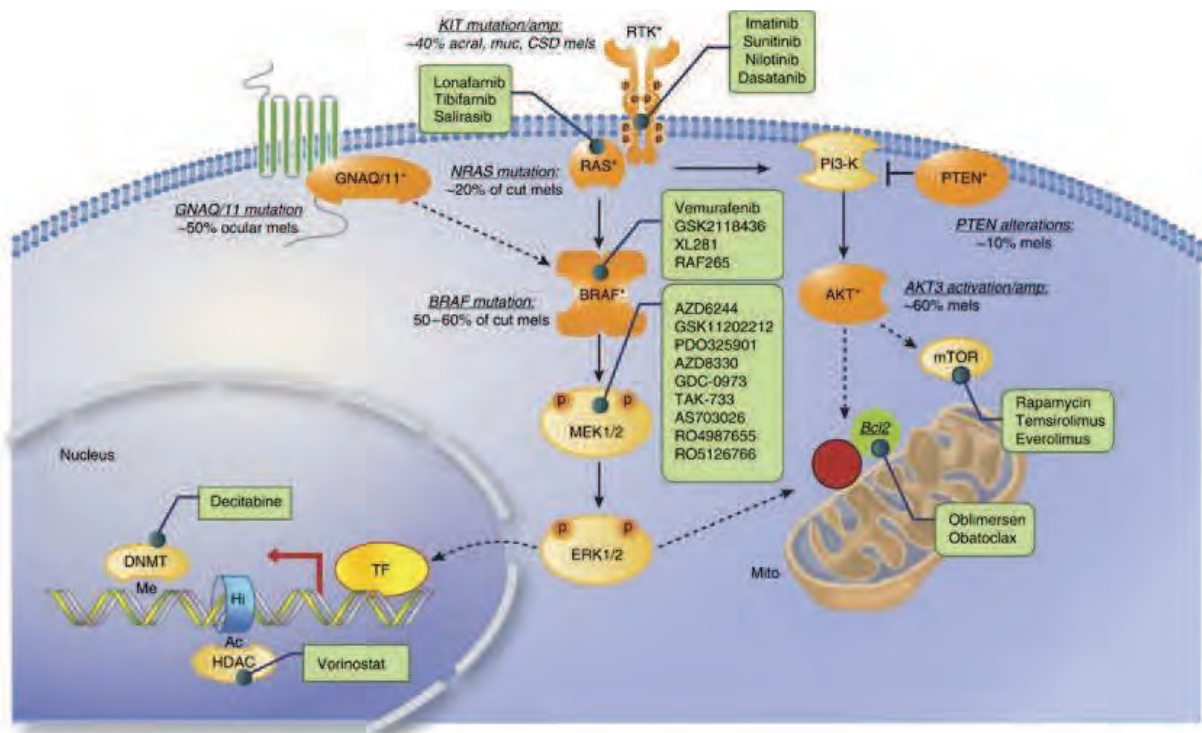


inhibiteur de récepteur tyrosine kinase, le **dasatinib**, a été rapportée pour des patients avec la mutation c-KIT<sup>L576P</sup>. Le **nilotinib**, un inhibiteur de tyrosine kinase (c-KIT, PDGFR et BCR-ABL) de seconde génération est actuellement testé chez des patients avec des mélanomes altérés pour KIT qui sont résistants ou intolérants aux autres inhibiteurs de tyrosine kinase (pour revue (Nikolaou *et al.*, 2012)).

#### Les inhibiteurs de la voie RAS/RAF/MAPK/ERK

**RAS** - Des inhibiteurs de farnésyl-transférase, tels que le **tipifarnib** et le **lonafarnib**, empêchent l'activation de RAS en inhibant la farnésylation post-traductionnelle de la protéine et du fait sa translocation à la membrane plasmique requise pour la dimérisation de RAF et la signalisation aval. Ces agents ont échoué en monothérapie mais sembleraient améliorer l'efficacité d'autres agents chimiothérapeutiques en combinaison. C'est le cas de la combinaison du lonafarnib avec le cisplatine qui augmenterait le taux d'apoptose de cellules de mélanome comparé au cisplatine seul. La combinaison du lonafarnib avec le sorafenib (un inhibiteur de kinase non sélectif) semblerait avoir des effets inhibiteurs sur la croissance du mélanome mais ces effets passeraient par la signalisation mTOR (Niessner *et al.*, 2011).

**RAF** - Compte tenu de la forte incidence de la mutation activatrice de BRAF dans le mélanome, plusieurs inhibiteurs de cette serine/thréonine kinase ont été testés. Le **Sorafenib** est un inhibiteur de RAF non sélectif qui inhibe également des récepteurs tyrosine-kinase comme le VEGFR, c-KIT et PDGFR ainsi que la tyrosine kinase FLT3. Les essais cliniques en monothérapie ont échoué et la combinaison du sorafenib avec le DTIC ou le témozolomide n'a apporté aucun bénéfice clinique aux patients avec un mélanome métastatique. Actuellement, d'autres inhibiteurs de BRAF plus sélectifs ont été développés et sont en cours d'essais cliniques. Le **vemurafenib** (PLX4032, Zelboraf®) est un inhibiteur de BRAF avec une sélectivité d'environ 30 fois supérieure pour la forme oncogénique BRAF<sup>V600E</sup> par rapport à la forme sauvage. Ce composé, disponible oralement, a montré une efficacité nettement supérieure à la dacarbazine lors des essais cliniques (Chapman *et al.*, 2011). En août 2011, il a été approuvé par la FDA pour le traitement de patients présentant un mélanome métastatique ou non résecable muté pour BRAF. Les effets secondaires associés au vemurafenib sont notamment le développement de kératoacanthomes et de carcinomes spinocellulaires, autres tumeurs cutanées facilement reconnaissables et traitables. Le **GSK2118436** est un autre inhibiteur spécifique de BRAF en cours de développement clinique avec une sélectivité 100 fois supérieure pour la mutation BRAF<sup>V600E</sup>. Le taux de réponse objective serait comparable à celui observé avec le vemurafenib. L'inconvénient de ces agents est qu'ils ont une efficacité limitée due à des résistances dès 6 mois de traitement, aboutissant dans la plupart des cas à une rechute. Ces résistances feraient intervenir des



**Figure 9 - Principales voie de signalisation et cibles thérapeutiques dans le mélanome (Nikolaou et al., 2012).**

L'activation de la signalisation récepteur tyrosine kinase (RTK)-NRAS-BRAF-MEK-ERK est centrale dans une large proportion de mélanomes (mels), BRAF et NRAS étant les oncogènes les plus communément activés. En amont de RAS, KIT est amplifié ou activé dans une petite fraction de mélanomes acrolentigineux, muqueux (muc) et au niveau de sites exposés chroniquement au soleil (CSD). La stimulation de la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) a également lieu dans les mélanomes liée à la perte de PTEN ou à l'activation d'AKT3. De plus, *GNAQ* et *GNA11*, qui codent pour des protéines G- $\alpha$ , sont préférentiellement mutés dans les mélanomes oculaires. Les effecteurs en aval du réseau de signalisation activée entraînent l'augmentation de transcription de gènes de survie par des facteurs de transcription et des signaux de survie accrus dans la mitochondrie (Mito) via la régulation de protéines apoptotiques (rouge : pro-apoptotique; vert : pro-survie). Dans le noyau, l'extinction épigénétique de gènes suppresseurs de tumeur se fait par méthylation de l'ADN et/ou acétylation d'histones, qui sont médiées respectivement par des ADN méthyltransférases (DNMT) et des histone déacétylases (HDAC). Les agents ciblés listés dans les cadres inhibent les voies pathogénétiques centrales à des points d'action spécifiques et ont potentiellement un impact thérapeutique sur le mélanome. Ac, acétylation; Histone, Hi; cut, cutané; Me, méthylation (de l'ADN); TF, transcription factor.

voies dépendantes (via des mutations de NRAS, CRAF ou encore MEK1) et indépendantes (via une augmentation du PDGFR, activation de PI3K/AKT, etc.) des MAPKs (pour revue (Eggermont and Robert, 2011; Puzanov and Flaherty, 2010; Arkenau *et al.*, 2011)).

*MEK* - Les kinases MEK interviennent directement en aval de BRAF ce qui en fait des cibles d'intérêt particulier. Plusieurs inhibiteurs de MEK ont été testés en clinique sur des patients avec un mélanome métastatique. Le composé **AZD6244** est un inhibiteur sélectif de MEK1 et MEK2 qui a été testé dans des phases I/II en clinique ; il s'avèrerait sans bénéfice significatif en termes de taux de réponse objective ou de survie sans progression comparé au témozolomide (Kirkwood *et al.*, 2012). Le fait que la résistance aux inhibiteurs spécifiques de BRAF pourrait passer par une restauration de la signalisation de MEK ouvre la possibilité de combiner ces composés afin d'outre-passer cette résistance chimiothérapeutique. Cette approche est actuellement testée en clinique, en combinant le composé **GSK1120212**, un inhibiteur de MEK, avec le **GSK2118436**, un inhibiteur de BRAF. Les premiers résultats de cette étude semblent montrer une diminution des effets secondaires (kératoacanthomes et carcinomes spinocellulaires) par rapport aux agents seuls (pour revue (Arkenau *et al.*, 2011)). Un autre essai teste la co-inhibition des voies MAPK et PI3K/AKT en utilisant l'inhibiteur de MEK **AZD6244** et l'inhibiteur d'AKT **MK2206** chez des patients avec des mélanomes BRAF<sup>V600E</sup> n'ayant pas répondu aux inhibiteurs spécifiques de BRAF.

#### Les inhibiteurs de la voie PI3K

*mTOR* - Des analogues de la rapamycine ont été synthétisés et évalués pour le traitement de mélanome. C'est le cas du **temsirolimus** et de l'**everolimus** qui n'ont pas permis d'obtenir de réponse objective en phase II chez des patients avec un mélanome métastatique. Une étude en phase I/II est actuellement en cours afin de tester la combinaison du temsirolimus avec le sorafenib chez des patients avec des mélanomes de stade III/IV. De nouveaux inhibiteurs ciblant à la fois PI3K et mTOR (**XL765**) semblent être bien tolérés en phase I d'étude clinique.

Les thérapies ciblées ont permis d'avoir des réponses majeures en clinique, leur impact en termes de survie globale et de traitement reste néanmoins au cœur des investigations dans la lutte contre le mélanome (Tableau 4). Il est clairement établi que le mélanome est une maladie aux multiples facettes et les différentes signatures moléculaires orienteront le choix du traitement. Les mécanismes contribuant à la propension à la croissance et à la chimiorésistance tumorales restent à élucider. Il est tout de même bien admis que de nombreux acteurs, notamment des facteurs et cellules issus du microenvironnement tumoral, entrent en jeu et jouent un rôle particulièrement important dans le développement et la progression de ce cancer au pronostic sombre.

Target	Molecular eligibility	Drug	Phase	NCT ID	Conditions
RTK	ERBB4 mutation positive	Lapatinib	Phase II	NCT01264081	Unresectable metastatic melanoma
RTK	KIT alteration present	Nilotinib	Phase II	NCT01099514	Unresectable metastatic melanoma with KIT aberration
RTK	KIT alteration present	Sunitinib	Phase II	NCT00631618	Unresectable metastatic melanoma
RTK	KIT alteration present	Nilotinib	Phase II	NCT00788775	Unresectable metastatic melanoma, which failed other TKIs
RTK	KIT alteration present	Nilotinib	Phase II	NCT01168050	Unresectable metastatic melanoma
RTK	KIT alteration present	Sunitinib	Phase II	NCT00577382	Unresectable metastatic mucosal, acral/lentiginous melanoma
RTK	KIT mutation of exon 9, 11, 13, or exon 17 (Y822D and mutations D820Y, Y823D)	Nilotinib vs. dacarbazine	Phase III	NCT01028222	Unresectable metastatic melanoma
RTK (c-Kit selective)	KIT juxtamembrane mutation	Masitinib vs. dacarbazine	Phase III	NCT01280565	Unresectable metastatic melanoma
TK	KIT alteration present	Imatinib mesylate	Phase II	NCT00470470	Unresectable metastatic melanoma
TK	BRAF mutation positive	Lenvatinib (E7080)	Phase II	NCT01136967	Unresectable metastatic melanoma
TK	KIT mutations of exon 11 or 13	Dasatinib	Phase II	NCT01092728	Unresectable metastatic melanoma
BRAF	BRAF V600E- or V600K-mutation positive	GSK2118436	Phase II	NCT01266967	Unresectable metastatic melanoma to the brain
BRAF+MEK	BRAF mutation positive	GSK2118436+GSK1120212	Phase I	NCT01072175	Unresectable metastatic melanoma
BRAF	BRAF V600E mutation positive	GSK2118436 vs. dacarbazine	Phase III	NCT01227889	BRAF mutant unresectable metastatic melanoma
BRAF	BRAF V600 mutation positive	RO5212054 (PLX3603)	Phase I	NCT01143753	Colorectal cancer, malignant melanoma
BRAF	BRAF V600 mutation positive	Vemurafenib	Phase II	NCT01378975	Unresectable metastatic melanoma (brain metastases)
BRAF	BRAF V600E mutation positive	Vemurafenib	Phase III	NCT01307397	Unresectable metastatic melanoma
BRAF+MEK	BRAF V600 mutation positive	Vemurafenib+GDC-0973	Phase I	NCT01271803	Unresectable metastatic melanoma
MEK	BRAF WT	Docetaxel+selumetinib (AZD6244); docetaxel+placebo	Phase II	NCT01256359	Unresectable metastatic melanoma
MEK	BRAF V600E- or V600K-mutation positive	GSK1120212 vs. dacarbazine or paclitaxel	Phase III	NCT01245062	BRAF mutant unresectable metastatic melanoma
MEK	BRAF V600E or NRAS mutation positive	MEK162	Phase II	NCT01320085	BRAF or NRAS mutant unresectable metastatic melanoma
MEK	BRAF V600E- or V600K-mutation or a NRAS mutation (codons 12, 13, or 61) positive	Selumetinib (AZD6244)	Phase II	NCT00866177	Unresectable metastatic melanoma
MEK	No GNAQ/GNA11 restrictions	Selumetinib (AZD6244) vs. temozolomide	Phase II	NCT01143402	Unresectable metastatic uveal melanoma
MEK	BRAF V600E mutation positive	TAK-733	Phase I	NCT00948467	Unresectable metastatic melanoma
CDK	CDK4 mutation or amplification	PD 0332991	Phase II	NCT01037790	Advanced cancers
mTOR	BRAF V600E mutation positive	Temsirolimus+selumetinib (AZD6244)	Phase II	NCT01166126	Unresectable metastatic melanoma
RTK (c-MET)	No restrictions	ARQ197+sorafenib	Phase I	NCT00827177	Advanced cancers
RTK (VEGFR and c-MET)	No restrictions	Cabozantinib	Phase II	NCT00940225	Advanced cancers
RTK	No restrictions	Pazopanib+paclitaxel	Phase II	NCT01107665	Unresectable metastatic melanoma
RTK	No restrictions	Sunitinib	Phase II	NCT01216657	Chemorefractory melanoma
RTK	No restrictions	Sunitinib+cisplatin+tamoxifen	Phase II	NCT00489944	High-risk ocular melanoma
RTK	No restrictions	Sunitinib+dacarbazine	Phase I/II	NCT00859326	Unresectable metastatic melanoma
RTK	No restrictions	Sunitinib+hydroxychloroquine	Phase I	NCT00813423	Chemorefractory melanoma
TK	No restrictions	Lenvatinib (E7080)+dacarbazine	Phase I/II	NCT01133977	Unresectable metastatic melanoma
RAF	No restrictions	RAF265	Phase I	NCT00304525	Unresectable metastatic melanoma
RAF	No restrictions	XL281+famotidine	Phase I	NCT00451880	Advanced cancers
RAF (and other kinases)	No restrictions	Sorafenib+cisplatin+tamoxifen	Phase II	NCT00492505	High-risk stage III melanoma
RAF (and other kinases)	No restrictions	Sorafenib vs. placebo	Phase II	NCT01377025	Unresectable metastatic uveal melanoma
MEK	No restrictions	RO4987655	Phase I	NCT00817518	Advanced cancers
CDK	No restrictions	Dinaciclib	Phase I/II	NCT01026324	Unresectable metastatic melanoma
PI3K+MEK	No restrictions	BKM120+MEK162	Phase I/II	NCT01363232	Unresectable metastatic melanoma
PI3K/mTOR+MEK	No restrictions	BEZ235+MEK162	Phase I/II	NCT01337765	Unresectable metastatic melanoma

**Tableau 4 - Liste des thérapies ciblées dans le mélanome avancé actuellement en cours d'étude (Nikolaou *et al.*, 2012).** CDK, cyclin-dependent kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; RTK, receptor tyrosine kinase; TKI, tyrosine kinase inhibitor; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor; WT, wild type.

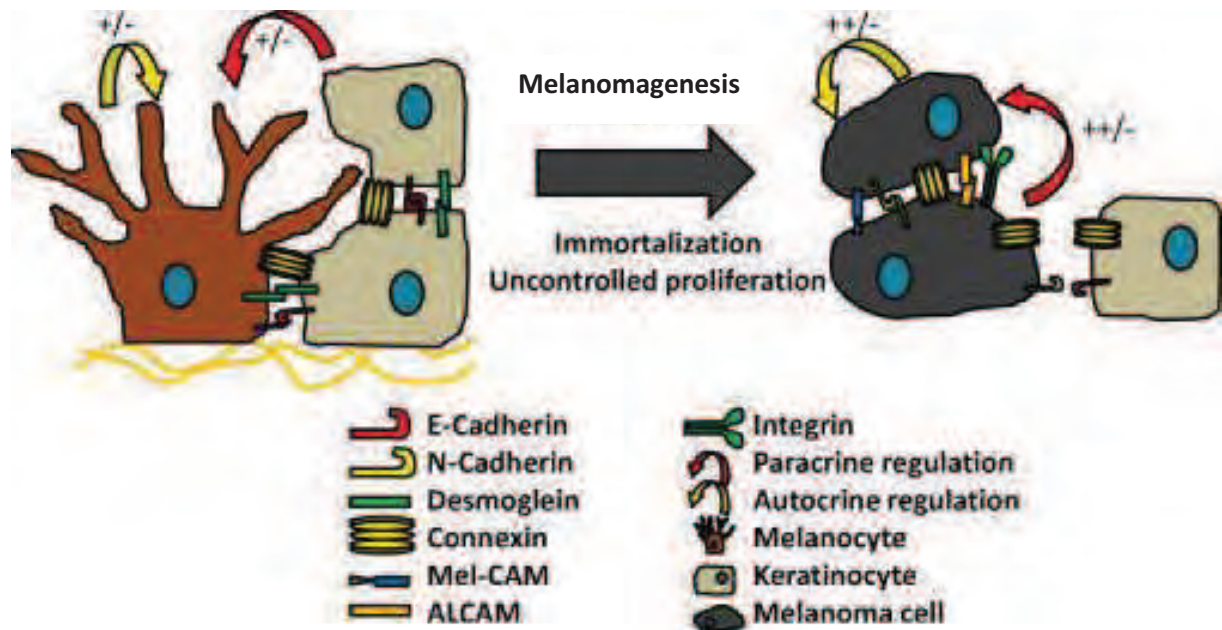
## **II. MICROENVIRONNEMENT TUMORAL : IMPORTANCE DU STROMA DANS LA PROGRESSION TUMORALE**

### **1. Le mélanome est une tumeur hétérogène**

Comme toute tumeur solide, le mélanome ne consiste pas en une entité homogène. Il est composé d'un mélange de cellules néoplasiques et de cellules stromales non-néoplasiques. Il s'agit principalement de fibroblastes/myofibroblastes qui sécrètent la matrice extracellulaire (MEC), de cellules vasculaires (cellules endothéliales et péricytes) assurant l'oxygénation et l'apport en nutriments, de cellules immunes et inflammatoires et de cellules graisseuses. L'ensemble de la tumeur et son microenvironnement est assimilable à un véritable organe/tissu dont la fonction est maintenue par des échanges réciproques entre les différents éléments qui le composent. Bien que les cellules stromales ne soient pas malignes, leur proximité avec les cellules cancéreuses et les interactions (directes ou indirectes) qu'elles établissent avec ces dernières altèrent leur phénotype et leur fonction pour fournir un environnement permissif à la tumeur, appelé stroma tumoral réactif. La répartition de ce dernier est irrégulière et varie considérablement d'une tumeur à l'autre. Sa similarité avec le granulome formé au cours du processus de cicatrisation a conduit Hal Dvorak à qualifier une tumeur de "plaie qui ne guérit jamais" (Dvorak, 1986). La communication établie au sein de ce microenvironnement à travers des contacts cellule-cellule et des échanges moléculaires détermine le phénotype tumoral.

### **2. Les modifications d'adhésion intercellulaire**

Dans un contexte normal, les mélanocytes sont en contact étroit avec les kératinocytes basaux qui contrôlent leur prolifération via des facteurs de croissance paracrines et une communication intercellulaire via des molécules d'adhésion. Dès le stade de nævus, la dissociation physique des deux types cellulaires entraîne des changements morphologiques des mélanocytes qui deviennent polygonaux et leur passage dans le derme s'accompagne d'un profil antigénique proche de celui des cellules de mélanome. La co-culture de ces nævocytes avec des kératinocytes indifférenciés restaure un phénotype mélanocytaire normal. Cette plasticité phénotypique suggère que la transformation mélanocytaire n'implique pas, dans les premiers temps, d'événement génétique majeur mais résulte de la perte du contrôle physique par les kératinocytes basaux. Dans les stades plus avancés, les cellules de mélanome sont autonomes et ne répondent plus aux signaux des kératinocytes.



**Figure 10 - Interactions entre les kératinocytes, les mélanocytes et les cellules de mélanome** (Chatelain *et al.*, 2011).

Les mélanocytes interagissent avec les kératinocytes via la E-cadhérine, les desmogléines et les connexines (jonctions gap) qui permettent la communication par contact cellulaire. La prolifération des mélanocytes normaux est contrôlée par les kératinocytes par une régulation paracrine via la diffusion de cytokines et de facteurs de croissance. Au cours de la mélanomagenèse, les mélanocytes se transforment et deviennent immortels (par inactivation de protéines suppresseur de tumeur comme p16), les protéines d'interaction mélanocyte–kératinocyte sont perdues (E-cadhérine, desmogléine, connexines) et de nouvelles protéines entraînent des interactions mélanome–mélanome (N-cadhérine, Mel-CAM, intégrine, ALCAM et connexines). Les cellules de mélanome sont résistantes à l'inhibition de croissance et produisent de nouveaux facteurs de croissance stimulant la prolifération.

Comme vu dans le chapitre précédent, l'échappement au contrôle par les kératinocytes passe par un changement d'expression des cadhérines avec diminution de la E-cadhérine, principale molécule d'adhésion entre les mélanocytes et les kératinocytes et acquisition de la N-cadhérine. Ce changement permet l'interaction avec d'autres types cellulaires trouvés dans le derme, comme les fibroblastes et les cellules endothéliales, et augmente la motilité. De plus, la N-cadhérine confère un avantage de survie en inhibant des facteurs pro-apoptotiques comme Bad de façon dépendante de PI3K (pour revue (Hsu *et al.*, 2002)). La restauration fonctionnelle de l'expression de la E-cadhérine dans les cellules de mélanome s'accompagne d'un ralentissement de croissance en culture, réduit la tumorigénicité *in vivo* et confère un phénotype normal dépendant des kératinocytes en co-culture avec diminution de l'expression d'antigènes liés à l'invasion, comme la sous-unité  $\beta_3$  d'intégrine et MelCAM/MUC18/CD146 (Hsu *et al.*, 2000 b). La perte d'expression de la E-cadhérine dans les cellules de mélanome passe par les répresseurs transcriptionnels Slug et Snail. Au cours de la progression tumorale, la sécrétion autocrine du facteur HGF/SF favorise cette diminution ainsi que la perte de la desmoglérine 1, protéine de jonction cellulaire (Figure 10).

Parallèlement à la perte de la E-cadhérine, l'acquisition d'un phénotype invasif s'accompagne de modifications d'expression des intégrines, protéines transmembranaires hétérodimériques qui assurent l'adhésion à la matrice extracellulaire et qui jouent un rôle important dans la prolifération, la migration, l'invasion, l'angiogenèse et la survie (Moschos *et al.*, 2007). Deux sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$ , composent ces hétérodimères. Le domaine extracellulaire est le médiateur des interactions cellule-MEC alors que le domaine intracellulaire est relié au cytosquelette d'actine et à des protéines intracellulaires. La liaison d'un ligand sur le domaine extracellulaire aboutit à l'activation de cascades de signalisation telles que les voies des MAPKs, PI3K et NF- $\kappa$ B. A l'inverse, des molécules intracellulaires peuvent induire des changements conformationnels des intégrines, modifiant l'affinité pour des ligands de la MEC et contribuant à l'interaction dynamique des cellules tumorales avec leur microenvironnement. La transition de la phase radiale à la phase verticale de croissance est associée à une augmentation d'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , entraînant une augmentation de production du facteur anti-apoptotique Bcl-2 et de la métalloprotéase matricielle 2 (MMP2), une endopeptidase qui dégrade le collagène de la membrane basale (pour revue (Villanueva and Herlyn, 2008)). Les intégrines seraient ainsi des biocapteurs régulant le comportement cellulaire en réponse à des signaux du microenvironnement.

### **3. Le stroma joue un rôle clé dans l'invasion et la dissémination du mélanome**

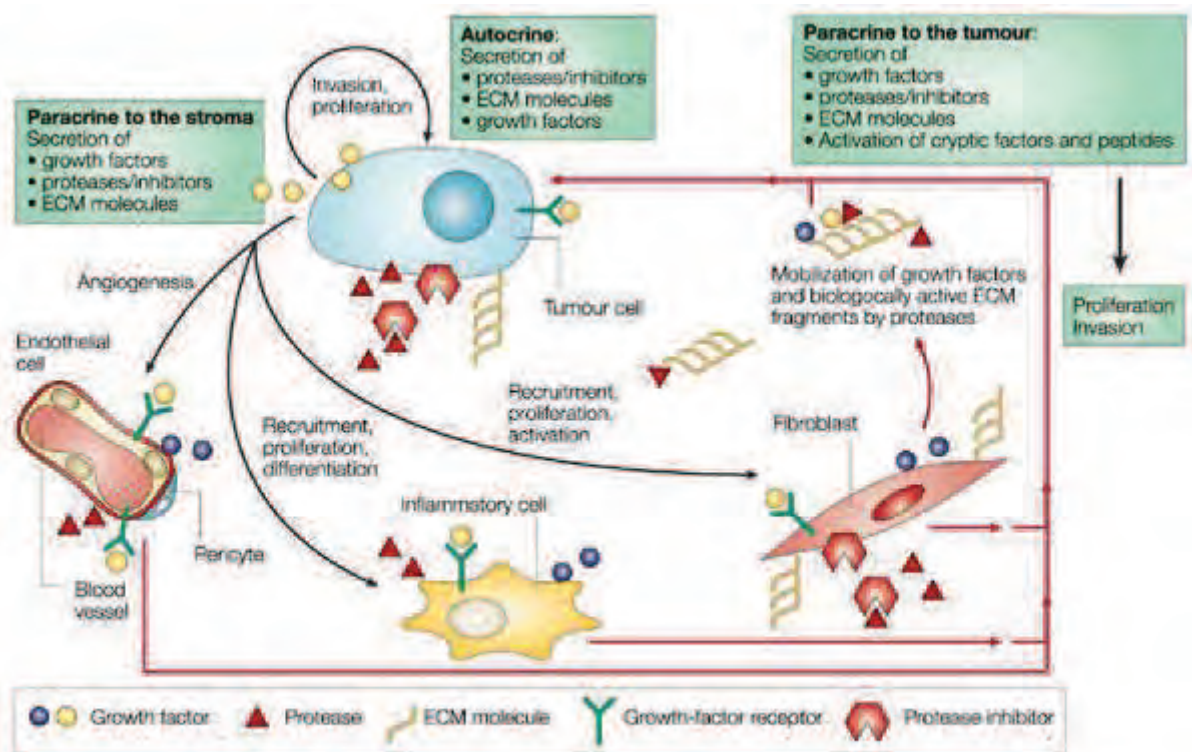
Dès 1889, Stephen Paget, un chirurgien anglais, proposait la théorie "seed and soil" suggérant que la dissémination métastatique ne se fait pas par hasard mais résulte d'une affinité particulière d'une cellule tumorale ("seed") pour un microenvironnement particulier ("soil") lui apportant un avantage de croissance. Le développement tumoral ne serait ainsi possible qu'en présence d'un microenvironnement favorable (Ribatti *et al.*, 2006).

Dans les stades initiaux d'invasion, les cellules de mélanome nécessitent la mise en place et l'activation d'un mécanisme leur permettant de migrer, d'envahir et de survivre en dehors de leur emplacement d'origine en vertu de nouvelles conditions microenvironnementales qui ne leur sont pas favorables. Les cellules cancéreuses vont générer un microenvironnement de soutien en produisant des facteurs de croissance qui modulent le stroma. Ceux-ci incluent le bFGF, les membres de la famille du VEGF, le PDGF, les ligands de l'EGFR, des interleukines, des CSFs, le TGF- $\beta$  et d'autres facteurs. Ces facteurs perturbent l'homéostasie du tissu normal et agissent de façon paracrine pour induire des réactions stromales comme l'angiogenèse et la réponse inflammatoire (pour revue (Mueller and Fusenig, 2004)). Ils agissent aussi sur d'autres types de cellules stromales comme les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et les adipocytes, ce qui entraîne la sécrétion de protéases et de facteurs de croissance additionnels (Figure 11).

### **4. Les fibroblastes sont les protagonistes de la "stromagenèse"**

Les fibroblastes sont les composants majoritaires du stroma et sont responsables de la production de la matrice extracellulaire. Au cours du remodelage tissulaire, les fibroblastes quiescents sont activés et deviennent des myofibroblastes. Lors de cicatrisation ou de fibrose, ces myofibroblastes acquièrent des fibres de stress contractiles exprimant l' $\alpha$ -SMA (pour  $\alpha$ -smooth muscle actin) et forment des contacts cellule-cellule par des jonctions gap. Lorsque le processus de cicatrisation est terminé, les fibroblastes activés sont éliminés par apoptose. La fibrose est caractérisée par une dérégulation de ce système et la persistance des fibroblastes activés dans le tissu, avec accumulation consécutive de MEC. Ce processus de "stromagenèse" est retrouvé dans le cancer. En effet, les fibroblastes sont extrêmement abondants dans le stroma de nombreuses tumeurs, dont les carcinomes pancréatiques, prostatiques et mammaires. Ils sont appelés CAFs ou TAFs (pour cancer/tumor-associated fibroblasts) et sont fonctionnellement et phénotypiquement très différents des fibroblastes cutanés normaux, ressemblant très étroitement à des myofibroblastes. La distinction entre ces CAFs et des fibroblastes activés physiologiquement vient de





**Figure 11 - Interactions entre les cellules tumorales et les cellules du stroma réactif environnant (Mueller and Fusenig, 2004).**

Les cellules tumorales activent le stroma environnant via la sécrétion de facteurs de croissance et de protéases, agissant de façon autocrine et paracrine. Ainsi, elles initient la sécrétion de composants spécifiques de la matrice extracellulaire (MEC) favorisant la migration et l'invasion, et inhibent l'expression d'inhibiteurs de protéases. Le déséquilibre entre les protéases et leurs inhibiteurs entraînent alors la dégradation des composants de la MEC, résultant en la mobilisation de facteurs de croissance liés à la matrice et en la génération de fragments de MEC réactifs. En association avec les facteurs de croissance dérivés de la tumeur, ces molécules induisent l'angiogenèse et recrutent et activent les fibroblastes stromaux et les cellules inflammatoires. Les fibroblastes sécrètent alors des facteurs de croissance et des protéases qui amplifient cette cascade de signaux, établissant ainsi un stroma activé et promouvant la croissance de la tumeur maligne.

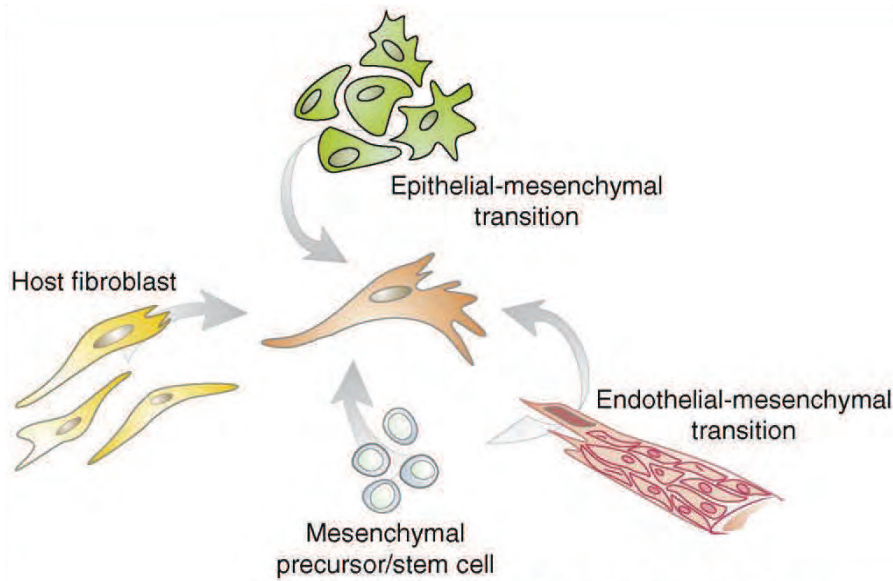
la persistance de leur activation sans retour au phénotype normal ou élimination par apoptose, comme dans la fibrose, entraînant le phénomène de desmoplasie tumorale avec production excessive de MEC. Les CAFs sont identifiés par leur morphologie fusiforme et l'expression de marqueurs d'activation dont le principal est l' $\alpha$ -SMA. D'autres marqueurs comme la FSP (fibroblast-specific protein) ou la FAP (fibroblast-activation protein) ainsi que la surexpression du PDGFR- $\beta$  sont également fréquemment observés dans le stroma des tumeurs solides (pour revue (Cirri and Chiarugi, 2012; Kalluri and Zeisberg, 2006)). D'autres protéines exprimées par les fibroblastes stromaux ont été associées à une valeur pronostique pour des tumeurs solides. C'est le cas du suppresseur de tumeur p53 de mauvais pronostic lorsqu'il est exprimé dans les CAFs de carcinome canalaire (Hasebe *et al.*, 2010). Au contraire, l'expression de la cavéoline-1, de PTEN ou de la podoplanine (marqueur des cellules endothéliales lymphatiques) dans le stroma tumoral est corrélée à un pronostic favorable dans beaucoup de cancers (Trimboli *et al.*, 2009; Witkiewicz *et al.*, 2009; Yamanashi *et al.*, 2009). De même, l'inactivation de p53 ou l'inactivation génique de PTEN dans les fibroblastes stromaux exerce un effet promoteur de tumeur dans le carcinome mammaire, en accélérant à la fois la prise et la progression tumorales (Hill *et al.*, 2005; Kiaris *et al.*, 2005; Trimboli *et al.*, 2009).

La stromagenèse s'effectue en quatre étapes : (1) recrutement des fibroblastes, (2) activation et prolifération de ces fibroblastes, (3) différenciation en myofibroblastes et (4) différenciation en fibrocytes synthétisant une MEC permissive pour la tumeur.

Les CAFs représentent des populations cellulaires hétérogènes qui diffèrent d'une tumeur à l'autre et la variabilité des marqueurs qu'ils expriment sont la signature de leurs origines multiples.

#### **4.1. Les différentes origines des CAFs**

L'origine des CAFs fait l'objet d'une vaste discussion. Plusieurs théories ont été proposées, suggérant une activation des fibroblastes tissulaires locaux, une transition épithélio- ou endothélio-mésenchymateuse, ou encore un recrutement de précurseurs circulants dérivés de la moelle osseuse (Figure 12).



**Figure 12 - Origine des CAFs** (Ostman and Augsten, 2009).

Les fibroblastes locaux ou dérivés de la moëlle osseuse sont recrutés au niveau de la tumeur en développement et adoptent un phénotype de CAF sous l'influence du microenvironnement tumoral. Les CAFs ont aussi été suggérés comme originant de cellules épithéliales ou endothéliales par transition épithélio/endothélio-mésenchymateuse.

Les données soutenant l'activation des cellules à partir d'un pool de **fibroblastes locaux** ne sont pas clairement établies et viennent d'observations expérimentales menées *in vitro* démontrant que des facteurs comme le TGF- $\beta$  peuvent induire l'expression de l' $\alpha$ -SMA par des fibroblastes normaux (Rønnov-Jessen and Petersen, 1993). Cependant, l'acquisition d'autres caractéristiques de CAFs et la stabilité du phénotype activé expérimentalement n'ont pas été établies. Ces données suggèrent que des facteurs solubles potentiellement sécrétés par les cellules tumorales peuvent entraîner des altérations phénotypiques et fonctionnelles des fibroblastes environnants.

Une autre théorie implique une **transition épithélio-mésenchymateuse** (EMT) des cellules tumorales qui se détacheraient et adopteraient un phénotype de type mésenchymateux avec des capacités invasives et migratoires (Petersen *et al.*, 2003). On peut donc penser que les altérations géniques présentes dans les cellules cancéreuses se retrouveraient dans les CAFs. Des études évaluant les composantes tumorales et stromales dans un modèle de cancer ovarien ont révélé que des altérations étaient présentes de part et d'autre mais n'étaient que rarement identiques (Tuhkanen *et al.*, 2004). Cette origine ne concernerait donc qu'une faible proportion de CAFs et doit encore être confirmée.

Une alternative à cette théorie est celle d'une **transition endothélio-mésenchymateuse** (EndMT). La similarité entre les myofibroblastes et les cellules musculaires lisses vasculaires ainsi que

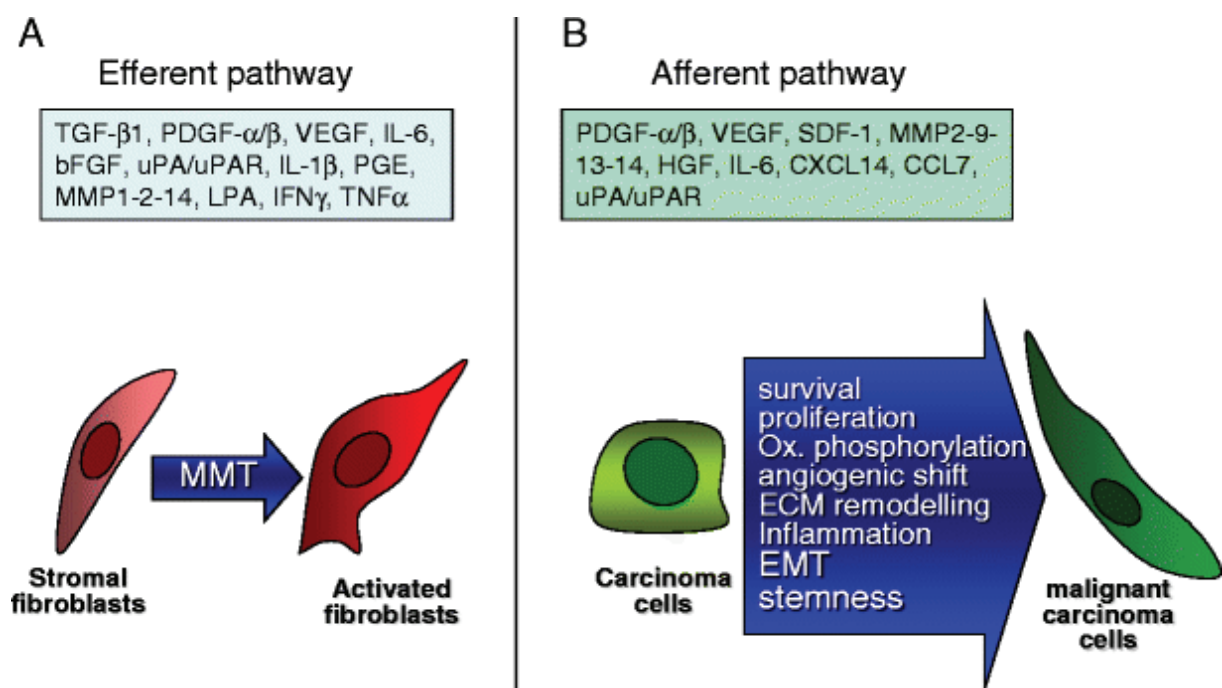
les péricytes a conduit à proposer une origine vasculaire pour les CAFs. Cette proposition est soutenue par une étude ayant montré que le TGF- $\beta$ 1 était capable d'induire une conversion phénotypique de cellules endothéliales en cellules de type fibroblastique avec apparition du marqueur FSP1 et perte de l'expression de CD31/PECAM. Cette observation a été validée *in vivo* dans des modèles de mélanome B16F10 et de carcinome pancréatique Rip-Tag2 (Zeisberg *et al.*, 2007).

Enfin, la dernière théorie s'opposant au recrutement local fait appel aux **cellules souches dérivant de la moelle osseuse**. Des études de transfert de moelle ont mis en évidence que ces précurseurs au haut degré de plasticité pouvaient agir comme des CAFs après invasion de la tumeur (Direkze *et al.*, 2004). Il n'est pas encore déterminé si l'activation de ces cellules résulte de l'environnement tissulaire ou bien s'il s'agit d'un sous-ensemble de cellules au phénotype déjà activé qui seraient recrutées préférentiellement au niveau des tumeurs.

La transdifférenciation des CAFs reste encore mal comprise. Le TGF- $\beta$ 1 est un des principaux facteurs pro-fibrotiques dérivés de la tumeur affectant l'activation des CAFs. Cependant, le PDGF- $\alpha/\beta$ , le bFGF et l'IL-6 peuvent également être sécrétés par les cellules cancéreuses pour activer les CAFs. L'origine et les mécanismes d'activation de ces fibroblastes diffèrent probablement selon le tissu et résultent d'une combinaison des différents signaux et types cellulaires.

#### **4.2. Le rôle des CAFs dans la progression tumorale**

Les CAFs interviennent de différentes façons au cours la progression tumorale, avec la capacité soit d'inhiber soit de stimuler la croissance des cellules malignes. En effet, tout comme les cellules immunes, les CAFs répriment les stades précoces de la progression tumorale, principalement en exerçant une inhibition de contact sur les cellules cancéreuses en formant des jonctions gap entre fibroblastes activés (pour revue (Räsänen and Vaheri, 2010)). Par la suite, les CAFs recrutés sont activés par des facteurs sécrétés par les cellules tumorales et vont alors promouvoir la croissance et la progression tumorale. Une influence réciproque entre les cellules stromales et les cellules cancéreuses va s'exercer par l'établissement d'une communication bi-directionnelle entre ces différents types cellulaires. Les cellules cancéreuses, à travers l'activation des fibroblastes, vont induire la sécrétion de facteurs de croissance et la production/dégradation de MEC favorisant leur malignité et augmentant leur agressivité (Figure 13).



**Figure 13 - Interaction entre les cellules tumorales et les CAFs : voies efférente et afférente** (Cirri and Chiarugi, 2012).

La progression tumorale nécessite une boucle de régulation entre cellules cancéreuses et CAFs. Les cellules cancéreuses induisent et maintiennent le phénotype activé des fibroblastes qui, à leur tour, produisent une série de facteurs de croissance et cytokines soutenant la progression tumorale par la promotion du remodelage de la MEC, de la prolifération cellulaire, de l'angiogenèse et de la transition épithélio-mésenchymateuse. **(A)** La voie efférente : sont indiqués une liste de facteurs sécrétés par les cellules cancéreuses impliqués dans la transition mésenchymo-mésenchymateuse (MMT) des fibroblastes vers leur activation. **(B)** La voie afférente : sont indiqués des facteurs sécrétés par les CAFs affectant le devenir et l'agressivité des cellules cancéreuses. Les phénotypes affectés par les CAFs, listés dans la flèche, incluent la survie, la prolifération, le métabolisme, l'angiogenèse, le remodelage de la MEC, le recrutement de cellules inflammatoires, l'activation de la transition épithélio-mésenchymateuse et l'acquisition de caractéristiques de cellules souches.

#### **4.2.1. Production de composants de la MEC**

L'infiltration de la tumeur par les fibroblastes se traduit par une production accrue et une accumulation excessive de matrice extracellulaire, appelée desmoplasie. Ce phénomène a été associé à un mauvais pronostic (Hasebe *et al.*, 2002) et observé au niveau de sites métastatiques (Kaplan *et al.*, 2005). La composition de la MEC est dynamique et influence les réponses cellulaires (morphologie cellulaire, prolifération, différenciation, migration...) selon sa structure et son architecture. Ainsi, l'architecture de la MEC associée aux tumeurs est fondamentalement différente du stroma pré-existant au sein des tissus. En effet, alors que le composant principal de la MEC dans le derme est le collagène I formant des fibres parallèles à l'épiderme, ce réseau fibrillaire est désorganisé lors de la progression de mélanome et l'expression de composants comme la fibronectine, la ténascine C et les laminines est augmentée (pour revue (Cirri and Chiarugi, 2012; Ruitter *et al.*, 2002)). Au sein de cette matrice, on trouve également différents types de collagènes (I, III, VI, XV et XVIII), de la fibrine, de l'acide hyaluronique ainsi que d'autres protéoglycanes matriciels. La fibronectine est ligand de nombreuses intégrines et régule la structure fibrillaire du collagène, jouant ainsi des rôles importants dans l'adhésion, la croissance et la migration cellulaires (Pankov and Yamada, 2002). Les fibroblastes activés représentent la principale source de matrice extracellulaire.

Il est également important de noter que la MEC représente un réservoir de facteurs de croissance, qui sont libérés lors de sa dégradation par des protéases matricielles. C'est le cas du VEGF et du bFGF pour lesquels des taux importants sont associés à la matrice et libérés après digestion par des MMPs afin de promouvoir la vascularisation et l'angiogenèse tumorales (Mahabeleshwar and Byzova, 2007). Une étude a montré l'implication de la MMP-13 produite par les fibroblastes dans ce processus (Lederle *et al.*, 2010).

#### **4.2.2. Remodelage de la MEC : les métalloprotéases matricielles**

La dégradation et le remodelage de la MEC du microenvironnement tumoral vont influencer la prolifération, la survie et la migration des cellules cancéreuses et sont des étapes essentielles pour l'invasion tumorale. Les CAFs jouent un rôle majeur dans ces changements compte tenu du fait qu'ils sont responsables de la production des protéines de la MEC (collagènes, fibronectine). Ils sécrètent des composants pro-migratoires comme la ténascine ainsi que des protéases de dégradation matricielle en réponse à différents facteurs. Différents systèmes protéolytiques ont été impliqués dans la progression du mélanome, incluant l'activateur du plasminogène, des aspartyl- et cystéine-protéases et les métalloprotéases matricielles (MMPs). Les MMPs ont été particulièrement étudiées et sont surexprimées dans de nombreux cancers. Il est classiquement admis qu'une augmentation de

leur activité est corrélée à une dégradation plus importante de la MEC et une facilité accrue pour les cellules tumorales d'envahir les tissus et de former des métastases.

Les MMPs sont des endopeptidases zinc-dépendantes capables de dégrader un ou plusieurs composants de la MEC. A ce jour, plus de 22 différentes MMPs ont été identifiées, clonées et caractérisées chez l'homme. Classées en fonction de leur structure et de leur spécificité de substrat, on distingue six différents groupes: les matrilysines (MMP-7, MMP-26), les collagénases (MMP-1, -8, -13), les gélatinases (MMP-2, -9), les stromélysines (MMP-3, -10, -11), les métalloprotéases de type membranaire (de MT1-MMP à MT6-MMP) et les autres (Chantrain and DeClerck, 2002).

#### **4.2.2.1. Expression et régulation des MMPs**

L'expression génique des MMPs est constitutivement faible mais peut être induite dans des conditions physiologiques ou pathologiques qui nécessitent un remodelage de la MEC. Elle est régulée aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel. Les facteurs qui influencent la transcription des MMPs sont des cytokines, des facteurs de croissance, des hormones, des oncogènes et des promoteurs de tumeurs (Westermarck and Kähäri, 1999) et peuvent être synthétisés à la fois par les cellules tumorales et les cellules stromales. Par exemple, la cytokine IL-8 est capable d'activer MMP-2, alors que l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  augmentent l'expression de MMP-9 (pour revue (Hsu *et al.*, 2002)). Au niveau de la séquence promotrice, le site de liaison AP-1 qui est reconnu par des facteurs de transcription des familles Jun et Fos semble jouer un rôle important dans l'activation transcriptionnelle des MMPs humaines (pour revue (Hofmann *et al.*, 2005)). Au niveau protéique, l'activité biologique des MMPs est déterminée par leur état d'activation. Pour la plupart, les MMPs sont sécrétées sous forme latente (pro-MMPs) et doivent être activées pour exercer leur rôle protéolytique. Leur activation dans l'espace extracellulaire fait intervenir des sérine-protéases comme la plasmine et l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA), ou d'autres membres de la famille des MMPs. A la surface cellulaire, les MT-MMPs ont été identifiées comme activateurs physiologiques de certaines MMPs, c'est notamment le cas pour l'activation de MMP2 par MT1-MMP. L'activité extracellulaire des MMPs est régulée par des inhibiteurs physiologiques tissulaires appelés TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2, -3 et -4), qui permettent une dégradation sélective et contrôlée des protéines de la matrice. Les TIMPs se lient aux pro-MMPs ou aux MMPs actives, inhibant l'activation autocatalytique des enzymes latentes et la capacité protéolytique des protéases actives (pour revue (Ntayi *et al.*, 2004)).

#### 4.2.2.2. Les MMPs dans le mélanome

Les cellules de mélanome expriment de nombreuses MMPs dont MMP-1, -2, -9, -16 et MT1-MMP ainsi que TIMP-1, -2 et -3 (Hofmann *et al.*, 2000 a). Différents modèles d'invasion *in vitro* ont permis de corrélérer l'expression des MMP-1,-2 et -9 au phénotype invasif de cellules de mélanomes. La MMP-2 serait détectée principalement dans des cellules de mélanome très invasives (Kurschat *et al.*, 1999) alors que la MMP-9 ne serait exprimée que par des cellules issues de mélanome en phase horizontale de croissance (MacDougall *et al.*, 1999). Dans un modèle de xénogreffes chez la souris, l'augmentation d'expression de la forme active de MMP-2 a été corrélée aux capacités métastatiques de différentes lignées de mélanome (Hofmann *et al.*, 1999). Par ailleurs, une diminution de la croissance tumorale a été observée chez des souris déficientes pour le gène MMP-2, et la surexpression de MT1-MMP dans des cellules de mélanome provoquerait une croissance tumorale plus rapide (Sounni *et al.*, 2002).

Chez l'homme, une expression accrue de MMP-2 a été observée dès les stades de dysplasie mélanocytaire atypique et corrélée au développement de métastases hématogènes dans les stades tardifs, associé à un mauvais pronostic (Väisänen *et al.*, 1996). Une étude sur soixante lésions mélanocytaires humaines comprenant les différents stades de progression tumorale a mis en évidence la surexpression de MMP-2 et MT1-MMP dans les mélanomes primaires et les métastases (Hofmann *et al.*, 2000 b). Les cellules exprimant MMP-2 co-expriment MT1-MMP et TIMP-2. Les cellules positives pour ces MMPs sont localisées à l'interface entre le stroma tumoral et le front invasif de la tumeur, et les MMPs sont également trouvées dans les cellules stromales, soulignant la contribution des protéases dérivées de l'hôte dans la progression tumorale (Hofmann *et al.*, 2003). Il a d'ailleurs été démontré que les MMPs présentes au niveau du front invasif sont souvent produites non pas par les cellules tumorales mais par les cellules stromales (fibroblastes, cellules endothéliales, macrophages) stimulées spécifiquement par les cellules cancéreuses (Basset *et al.*, 1997). Notamment, les cellules cancéreuses ont la capacité d'induire la sécrétion de MMP-2 par des fibroblastes normaux via la fibronectine associée aux cellules tumorales (Saad *et al.*, 2002).

L'induction de MMP-1 est également corrélée à la progression du mélanome et une forte expression de MMP-1 et -3 serait corrélée à une durée de survie sans maladie plus courte dans les cas de mélanome métastatique (Nikkola *et al.*, 2002).

Concernant MMP-9, chez l'homme, une relation inverse a été montrée entre l'expression *in situ* de cette protéase et la progression du mélanome suggérant son implication dans les premiers événements de dégradation de la MEC et d'invasion (van den Oord *et al.*, 1997). Ces données sont controversées chez la souris, et des cellules exprimant constitutivement MMP-9 montrent une



colonisation pulmonaire accrue dans des modèles expérimentaux de métastases. D'autre part, la formation de métastases est abolie chez des souris déficientes pour cette protéase (Itoh *et al.*, 1999).

#### 4.2.2.3. Interactions des MMPs avec les molécules d'adhésion cellulaire

Comme mentionné précédemment, les intégrines sont des récepteurs multifonctionnels impliqués non seulement dans l'ancrage cellulaire à la MEC et la motilité cellulaire, mais également dans la régulation de gènes et de l'apoptose. L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , surexprimée dans les mélanomes invasifs et métastatiques, est associée à la tumorigénicité, l'invasivité et au potentiel métastatique et favorise l'attachement des cellules et leur migration à travers la laminine, la fibronectine et la vitronectine (Danen *et al.*, 1994). Il a été démontré que la forme protéolytiquement active de MMP-2 se liait directement à cette intégrine  $\alpha_v\beta_3$  et faciliterait la dégradation de la matrice et l'invasion cellulaire (Brooks *et al.*, 1996). L'interaction de MMP-2 avec  $\alpha_v\beta_3$  favoriserait le positionnement des MMPs actives à la surface cellulaire, permettant une dégradation dirigée de la MEC. D'autre part, la liaison de la forme active de MMP-2 à l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  à la surface des cellules endothéliales semblerait faciliter l'invasion vasculaire lors de l'angiogenèse. La dissociation de ce complexe inhibe l'angiogenèse et la croissance tumorale (Silletti *et al.*, 2001).

Le récepteur de l'acide hyaluronique CD44 à la surface cellulaire favorise la dégradation du collagène IV et l'invasion tumorale par ancrage de MMPs actives à la surface cellulaire. De fait, le traitement de cellules de mélanome avec un anticorps monoclonal anti-CD44 entraîne une augmentation de production de MMP-2 (Takahashi *et al.*, 1999).

Les interactions complexes entre les molécules d'adhésion et les MMPs ainsi que leurs rôles dans la progression du mélanome restent tout de même à élucider.

#### 4.2.2.4. Autres rôles des MMPs dans le cancer

Les MMPs ont tout d'abord été impliquées dans la perte d'adhérence cellulaire et la modification phénotypique des cellules qui se produisent durant les premiers stades de tumorigenèse et leur rôle dans l'invasion a été parmi les mieux étudiés.

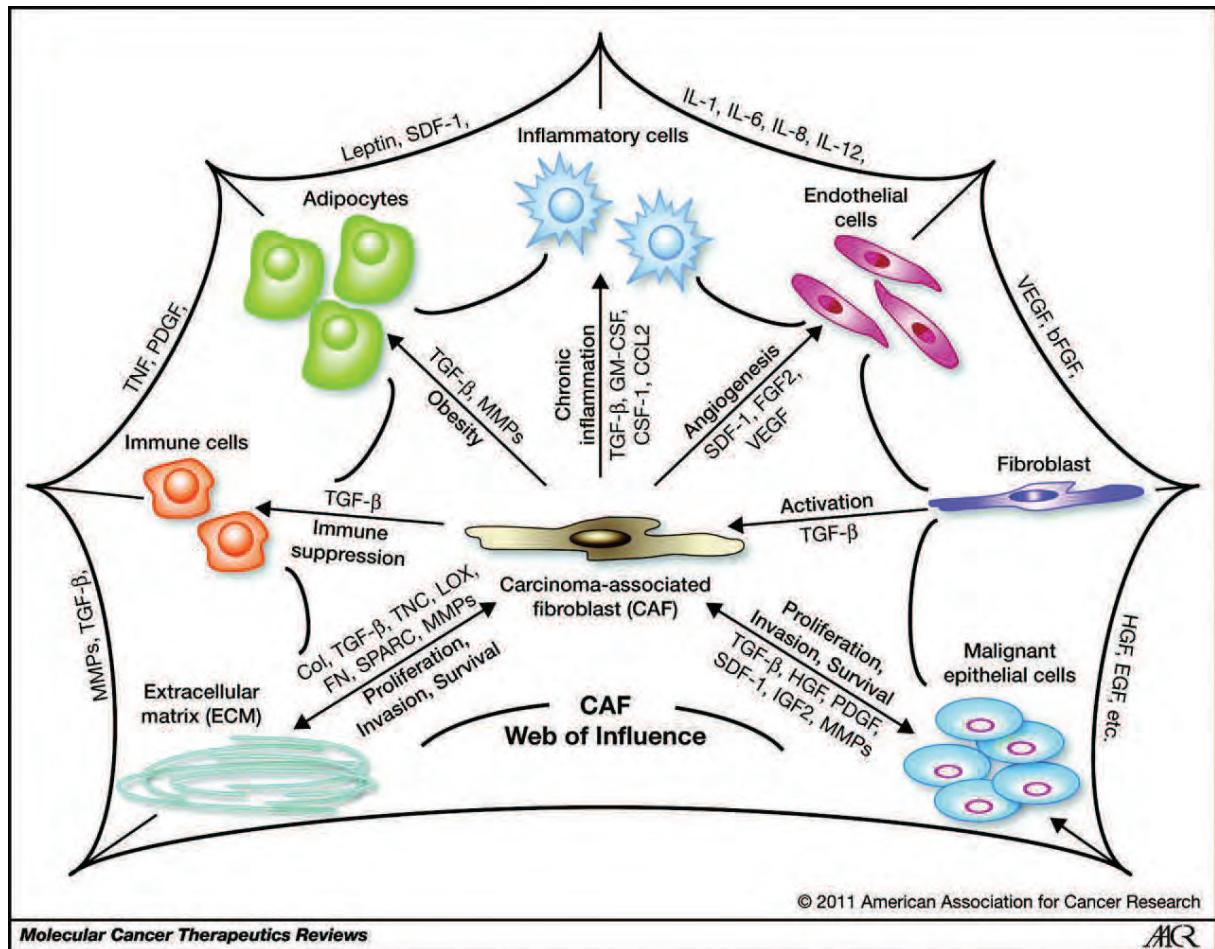
Cependant, une autre étape de la progression tumorale dans laquelle les MMPs ont été impliquées est la **prolifération** des cellules tumorales. Plusieurs MMPs comme la stromélysine sont capables de digérer des protéines extracellulaires qui séquestrent les facteurs de croissance comme c'est le cas de l'IGFBP-3 (insulin-like growth factor binding protein 3) qui se lie à l'IGF-II (insulin-like growth factor II) ou du perlécan qui séquestre le bFGF. D'autres MMPs peuvent aussi augmenter l'activité biologique de cytokines et de facteurs de croissance comme cela a été démontré pour l'IL-8

dont l'activité augmente dix fois après digestion par MMP-9. Enfin, par leur capacité à solubiliser des récepteurs membranaires de cytokines et diminuer ainsi leur activité biologique, plusieurs MMPs ont paradoxalement un effet anti-prolifératif (pour revue (Chantrain and DeClerck, 2002)). Les MMPs peuvent également agir sur la prolifération des cellules tumorales par des modifications structurales des protéines de la MEC. Par exemple, la dégradation du collagène fibrillaire par les MMPs permet aux cellules de mélanome d'activer l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$ , de diminuer l'expression de la protéine p27 et de stimuler ainsi la prolifération cellulaire (Henriet *et al.*, 2000). De la même manière, l'exposition de cellules de mélanome à du collagène protéolysé leur permet de se protéger de l'apoptose (Petitclerc *et al.*, 1999).

L'**angiogénèse** est une autre étape de la progression tumorale dans laquelle les MMPs sont impliquées et peuvent avoir un effet stimulateur ou inhibiteur. Plusieurs MMPs sont exprimées par les cellules endothéliales et jouent un rôle important dans la dégradation de la MEC qui accompagne l'invasion du tissu tumoral par les vaisseaux sanguins. Certaines MMPs augmentent la libération de facteurs angiogéniques comme le VEGF mais également de facteurs anti-angiogéniques à partir de précurseurs. C'est le cas de l'angiostatine et de l'endostatine qui sont produites par les MMP-2, -7 et -9 ou la MMP-12 à partir de précurseurs comme le plasminogène et le collagène XVIII (pour revue (Chantrain and DeClerck, 2002)).

#### **4.2.3. Interactions cellules de mélanome - fibroblastes via les facteurs de croissance**

Les facteurs de croissance dérivés des cellules de mélanome, tels que le bFGF, le PDGF, le VEGF et le TGF- $\beta$ , peuvent agir comme facteurs de croissance paracrines pour stimuler les fibroblastes et les cellules endothéliales (Ruiter *et al.*, 2002). Les fibroblastes activés vont à leur tour produire des facteurs de croissance comme le VEGF, IGF-1, HGF/SF, bFGF et TGF- $\beta$  pour soutenir la croissance tumorale. Ces effets paracrines réciproques créent une boucle de rétroaction positive entre les cellules tumorales et le stroma (Figure 14).



**Figure 14 - Mécanismes de promotion de la tumorigénèse par les CAFs** (Brennen *et al.*, 2012).

Les CAFs peuvent promouvoir la tumorigénèse directement par de multiples mécanismes, incluant la stimulation de l'angiogénèse, de la prolifération, de l'invasion et l'inhibition de la mort des cellules tumorales. Ces effets sont médiés par l'expression et la sécrétion de nombreux facteurs de croissance, cytokines, protéases et protéines de la MEC telles que SDF-1, FGF2, VEGF, TGF- $\beta$ , HGF, ténascine-c, LOX et les MMPs. Les CAFs peuvent également influencer la tumorigénèse indirectement via des effets sur de multiples autres types cellulaires, incluant les adipocytes et les cellules immunes et inflammatoires. De plus, des signaux paracrines (exemples listés autour du périmètre du réseau) dérivés de boucles de régulation avec ces cellules accessoires favorisent la croissance tumorale.

Ac, acétyl; AFC, 7-amino-4-(trifluorométhyl)coumarin; bFGF, basic fibroblast growth factor; CCL2, chemokine (C-C motif) ligand 2; Col, collagène; DPP-II (IV, 6, 7, 8, 9, 10), dipeptidyl peptidase-II (IV, 6, 7, 8, 9, 10); FN, fibronectine; GM-CSF, granulocyte macrophage colony-stimulating factor; HGF, hepatocyte growth factor; IGF2, insulin-like growth factor 2; LOX, lysyl oxidase; SDF-1, stromal cell-derived factor 1; SFRP-1, secreted frizzled-related protein 1; SPARC, secreted protein, acidic and rich in cysteine; TNC, ténascine-c.

Le **PDGF** sécrété par les cellules de mélanome sert de facteur de maintenance et de survie au mélanome en induisant le remodelage du stroma et la production de protéines de la MEC comme le collagène, la fibronectine et la laminine. Sachant que les cellules de mélanome n'expriment pas le récepteur au PDGF, son action est paracrine. Il entraîne la production et la sécrétion d'IGF-1, HGF, bFGF et ET3 par les fibroblastes, qui, à leur tour, stimulent la prolifération des cellules de mélanome de façon paracrine (pour revue (Micke and Ostman, 2004)). L'importance du PDGF dans les interactions tumeur-stroma a été mise en évidence par des études montrant que la surexpression du PDGF-B dans des cellules de mélanome n'exprimant pas le PDGFR et faiblement tumorigènes entraînait la formation de tumeurs robustes, avec un tissu conjonctif distinct et une abondance de vaisseaux sanguins, après injection sous-cutanée chez des souris nude (Forsberg *et al.*, 1993). Une autre étude a montré que la signalisation paracrine du PDGF-CC favorisait la croissance tumorale de mélanome via le recrutement de CAFs (Anderberg *et al.*, 2009). De plus, le PDGF est important pour le recrutement et la différenciation de péricytes et est considéré comme stabilisant les vaisseaux sanguins immatures et contribuant à leur intégrité fonctionnelle, révélant son importance pour la vascularisation tumorale (Furuhashi *et al.*, 2004).

Le **TGF- $\beta$**  est un des principaux facteurs impliqués dans le microenvironnement du mélanome. Il s'agit d'un facteur aux actions paradoxales puisqu'il a cette double capacité de pouvoir à la fois inhiber et soutenir la progression tumorale, en exerçant ses effets directement sur la tumeur elle-même ou indirectement sur le microenvironnement (Bierie and Moses, 2006). Les effets autocrines du TGF- $\beta$  se traduisent notamment par une diminution de la E-cadhérine et une augmentation des intégrines et de MMP-9, facilitant la migration des cellules de mélanome (Janji *et al.*, 1999). Ce facteur a la capacité d'inhiber la croissance des cellules épithéliales et des mélanocytes, mais ces effets se dissipent au cours de la progression tumorale et les cellules de mélanome deviennent résistantes à cette inhibition de croissance. Cette résistance serait liée à l'expression de répresseurs de la voie de signalisation TGF- $\beta$ /SMAD tels que Ski, Sno, endogline, filamine et follistatine (pour revue (Hussein, 2005)). D'autre part, le TGF- $\beta$  exerce une action paracrine sur le microenvironnement tumoral. C'est un des principaux facteurs responsables du recrutement des fibroblastes et de leur différenciation en myofibroblastes. Il participe notamment à leur activation en augmentant leur production de composants de la MEC comme les collagènes I, VI, XV et XVIII, la ténascine C, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1, des facteurs de croissance et des cytokines (pour revue (Lee and Herlyn, 2007)). Des expériences de co-injection sous-cutanée de cellules de mélanome avec des fibroblastes chez la souris ont mis en évidence que la surexpression du TGF- $\beta$  dans les cellules cancéreuses se traduisait par une augmentation de la croissance tumorale mais également du nombre et de la taille des métastases pulmonaires (Berking *et al.*, 2001). L'activation

des fibroblastes du stroma par le TGF- $\beta$  dérivé de la tumeur fournit ainsi un microenvironnement optimal pour la progression tumorale et les métastases (pour revue (Li *et al.*, 2003)).

Le TGF- $\beta$  contribuerait également à l'angiogenèse péri-tumorale en stimulant l'expression de facteurs pro-angiogéniques comme l'IL-8 et le VEGF. De plus, il active la croissance et la migration des cellules endothéliales, établissant ainsi une néovascularisation autour de la tumeur permettant d'accélérer son développement et sa dissémination (pour revue (Javelaud *et al.*, 2008)).

D'autre part, le TGF- $\beta$  est une cytokine immunosuppressive. Il contrôle l'homéostasie des lymphocytes-T en inhibant leur prolifération et leur activation, interfère avec la présentation d'antigènes et inhibe la fonction des cellules NK (pour revue (Javelaud *et al.*, 2008)). Ainsi, le TGF- $\beta$  participerait à l'échappement de la surveillance immune du mélanome.

L'ensemble de ces activités du TGF- $\beta$  contribue à la progression et à la dissémination du mélanome en facilitant les apports nutritionnels nécessaires à la croissance.

Le **bFGF** est surexprimé dans de nombreuses tumeurs, dont le mélanome, et son niveau d'expression semble corrélér avec la progression tumorale. En effet, les mélanocytes ont besoin de bFGF exogène pour leur croissance et leur survie alors que les mélanomes produisent et sécrètent ce facteur de croissance qui agit de façon autocrine sur la prolifération tumorale. Son action est médiée par des récepteurs tyrosine-kinase à la surface cellulaire, les FGFRs, exprimés à la fois par les mélanocytes et les cellules de mélanome. L'action autocrine du bFGF dérivé du mélanome passerait par une activation intracellulaire du récepteur. Concernant ses fonctions paracrines, le bFGF est connu pour ses propriétés angiogéniques et ses effets mitogènes sur de nombreux types cellulaires, incluant les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales. De plus, ce facteur est impliqué dans la formation du stroma et l'activation d'enzymes de dégradation apportant des capacités d'invasion aux cellules de mélanome à travers la MEC (pour revue (Lázár-Molnár *et al.*, 2000)). Cette protéine est également exprimée par les cellules stromales, et particulièrement par les fibroblastes activés. Son expression peut être induite par le PDGF dans les myofibroblastes alors que le TGF- $\beta$  est considéré comme un régulateur négatif. Ses fonctions seraient influencées par ses différentes localisations subcellulaires. Dans les cellules naïves, son expression nucléaire est prédominante alors qu'elle est cytoplasmique dans le mélanome malin. Cette localisation cytoplasmique est associée à la stimulation du VEGF et l'expression de HIF dans les cellules cancéreuses et stromales via l'activation de kinases telles les PI3K et MAPKs (Brychtova *et al.*, 2011).

L'**IGF-I** est un des facteurs de croissance les plus critiques pour la croissance et la survie des cellules mélanocytaires. Dans la peau humaine, l'IGF-I est principalement produit par les fibroblastes dermiques. Toutes les cellules mélanocytaires expriment son récepteur et ce de façon croissante

avec la progression tumorale. Les cellules de mélanome sembleraient se reposer sur l'IGF-I sécrété par les fibroblastes car elles n'en produisent pas elles-mêmes. Des données montrent que des cellules de stade précoce de mélanome sont activées par l'IGF-I pour phosphoryler ERK1/2 de la voie des MAPKs. IGF-I active également Akt, inhibe son effecteur GSK3- $\beta$  et stabilise  $\beta$ -caténine (Satyamoorthy *et al.*, 2001). Les mélanomes primaires tardifs et métastatiques ne répondent pas à la stimulation de croissance par l'IGF-I car ils présentent une activation constitutive de la voie des MAPKs et un taux élevé de  $\beta$ -caténine. Une étude plus récente a montré que l'IGF-I dérivant des fibroblastes pouvait induire l'expression d'IL-8 dans les cellules de mélanome à travers la voie MAPK/JNK/c-Jun/AP-1 (Satyamoorthy *et al.*, 2002). De plus, l'expression du VEGF peut être augmentée en réponse à un traitement par l'IGF-I (Akagi *et al.*, 1998; Bermont *et al.*, 2000) expliquant l'effet angiogénique de l'IGF-I.

Le facteur **HGF/SF** est une cytokine multifonctionnelle aux actions mitogènes, motogènes et morphogènes pour de nombreux types cellulaires via l'interaction avec son récepteur c-Met exprimé par les cellules épithéliales et les cellules mélanocytaires (pour revue (Bhowmick *et al.*, 2004 b)). Il s'agit d'un facteur essentiel dans les interactions épithélio-mésenchymateuses et plusieurs études lui accordent un pouvoir transformant (Birchmeier *et al.*, 2003). Il est produit principalement par les fibroblastes et stimule de façon paracrine la synthèse d'ADN et la croissance des mélanocytes et cellules de mélanome. HGF/SF diminue l'expression de la E-cadhérine et de la desmoglérine-1 dans les cellules mélanocytaires via l'activation de c-Met, la voie des MAPKs et PI3K (Li *et al.*, 2001 c). L'expression ectopique de ce facteur dans des kératinocytes affecte le développement des mélanocytes et aboutit à des lésions de mélanocytose dermique (Kunisada *et al.*, 2000). L'activation autocrine de la voie HGF/SF-c-Met est démontrée comme induisant le développement de mélanome malin et l'acquisition d'un phénotype métastatique chez la souris transgénique (Otsuka *et al.*, 1998). L'ensemble de ces données soulignent l'importance du rôle de HGF/SF dans la régulation du mélanome et de sa progression.

Le **VEGF**, facteur angiogénique majeur, stimule l'angiogenèse via l'activation locale de cellules endothéliales résidentes des vaisseaux préexistants et induit la vasculogenèse en recrutant des précurseurs endothéliaux circulants dérivés de la moelle osseuse. Le VEGF est surexprimé au cours de la progression et de la dissémination du mélanome. Les cellules inflammatoires infiltrant la tumeur sécrètent également des taux élevés de VEGF. L'hyperperméabilité des vaisseaux sanguins nouvellement formés liée au VEGF serait un facteur essentiel dans le processus métastatique du mélanome cutané primaire (Salven *et al.*, 1997). Au-delà de ses effets principalement paracrines, la présence du récepteur au VEGF (VEGFR) à la surface des cellules de mélanome suggère une action

autocrine de ce facteur (Liu *et al.*, 1995). D'autre part, des études sur des modèles animaux ont mis en évidence que le VEGF provenant de CAFs était important pour l'angiogenèse et la croissance tumorale (Dong *et al.*, 2004). Son expression est stimulée par de nombreux facteurs comme le PDGF, le bFGF, l'IL-1 et le TNF $\alpha$  ou encore par des conditions hypoxiques, expliquant ainsi son augmentation pendant l'expansion de la masse tumorale.

## 5. Les modèles d'étude

L'importance du microenvironnement dans le développement du cancer est clairement établie et les altérations stromales contribuent directement à la tumorigenèse. Ces observations soulèvent nécessairement plusieurs questions, à savoir quels sont les principaux acteurs et signaux impliqués dans les interactions tumeur-stroma, et lesquels dérivent spécifiquement des fibroblastes. Afin d'y répondre et d'identifier les facteurs impliqués dans cet environnement complexe, des modèles d'étude de cancers dépendants de fibroblastes ont été développés, allant de simples co-cultures à des modèles génétiques plus sophistiqués.

### 5.1. Modèles d'interaction tumeur-stroma *in vitro* en co-culture

Les interactions entre les fibroblastes et les cellules tumorales ont été caractérisées avec des modèles de co-culture *in vitro*. Ces études ont démontré que les cellules cancéreuses agissaient sur les fibroblastes et induisaient des changements conformément au phénotype myofibroblastique retrouvé dans le stroma tumoral ou dans le processus de cicatrisation (Rønnov-Jessen and Petersen, 1993). Etant des molécules centrales, le PDGF et le TGF- $\beta$  ont été identifiées comme responsables de ces effets. La stimulation par du TGF- $\beta$ , chimioattractant pour les cellules mésenchymateuses et induisant la différenciation en myofibroblastes, entraîne la sécrétion de composants de la MEC tels que des collagènes, de la fibronectine, des protéases et inhibiteurs de protéases. Bien qu'il n'induisse pas la différenciation myofibroblastique, le PDGF a des propriétés chimioattractantes et stimule la prolifération des myofibroblastes. Plusieurs autres facteurs, comme le bFGF et les IGFs ont fait preuve d'une influence fibroblastique sur la réponse des cellules cancéreuses *in vitro*.

De nombreuses données *in vitro* ont ainsi été accumulées, décrivant l'influence des fibroblastes sur la croissance de cellules malignes. Les premières études indiquaient un effet plutôt inhibiteur sur la croissance tumorale. La co-culture de cellules mésenchymateuses avec des cellules de carcinome mammaire induisait une différenciation histologique plus ordonnée (DeCosse *et al.*, 1975, 1973). Dans une autre étude, l'incubation de cellules de carcinome basocellulaire avec des

cellules stromales entraînant une perte de leurs propriétés malignes (Cooper and Pinkus, 1977). Ensuite, il est apparu que les cellules cancéreuses répondaient de façon très différente selon les types cellulaires utilisés (Maehara *et al.*, 2001). En particulier, les fibroblastes isolés à partir de tissus cancéreux (cultures primaires de CAFs) induisaient l'invasion ou la prolifération de cellules cancéreuses (Olumi *et al.*, 1999). Cependant, une minorité des études a été menée avec des CAFs ; dans la plupart des cas, des fibroblastes normaux ont été manipulés pour exprimer un facteur particulier d'intérêt supposé être exprimé par les CAFs *in vivo*.

Les modèles de co-culture restent des outils utiles pour étudier les interactions entre différents types cellulaires. Ces modèles présentent l'avantage de pouvoir analyser les voies de signalisation impliquées exclusivement de part et d'autre de la communication. La pertinence fonctionnelle peut être facilement vérifiée en inhibant ou en ajoutant un facteur voulu dans le système. Cependant, les modèles de co-culture reflètent difficilement l'environnement complexe trouvé *in vivo* et ne tiennent souvent pas compte de l'interaction étroite et de la multiplicité des signaux. De plus, la situation artificielle des cellules en culture après expansion entraîne un éloignement du phénotype des CAFs. C'est pourquoi les modèles ont été améliorés en ajoutant des protéines matricielles (matrigel ou collagène I) et en laissant pousser les cellules dans des structures en 3-dimensions. Dans ces systèmes, les structures formées par les cellules épithéliales à proximité des fibroblastes co-cultivés se rapprochent de celles trouvées au sein du tissu d'origine (épiderme). Les modèles de sphéroïdes décrits dans le chapitre précédent sont également utilisés pour étudier la réponse stromale, notamment en intercalant des fibroblastes dans la matrice de collagène avant implantation des sphéroïdes. Généralement, les fibroblastes répondent en infiltrant la tumeur et en augmentant leur prolifération et production de protéines de la MEC (Flach *et al.*, 2011; Smalley *et al.*, 2005). Enfin, une méthode d'étude similaire utilisant du collagène-I ou du matrigel a donné naissance à la théorie du mimétisme vasculogène, qui évoque la capacité des cellules de mélanome à former des canaux vasculaires indépendamment de cellules endothéliales ou du processus angiogénique (Maniotis *et al.*, 1999). Les modèles de reconstruction de peau décrits dans le chapitre précédent permettent aussi d'intégrer la composante stromale dans le système d'étude. Cependant, la plupart des concepts d'interaction tumeur-stroma ont ensuite été validés dans des modèles d'étude *in vivo*.



## 5.2. Modèles d'interaction tumeur-stroma *in vivo*

### 5.2.1. Modèles de co-injection

Le modèle d'étude le plus communément utilisé pour caractériser les effets du stroma est de simplement mélanger des cellules cancéreuses et des fibroblastes (et/ou des composants du stroma) et de les co-injecter à l'animal. Il a ainsi été montré que l'addition de fibroblastes transformés à des cellules cancéreuses humaines faiblement tumorigènes ou ne formant pas de tumeur chez la souris athymique diminuait le temps de latence et augmentait la fréquence de formation de tumeur (Camps *et al.*, 1990). Au-delà des effets positifs des fibroblastes sur la croissance tumorale, une autre étude a permis de révéler que l'ajout de fibroblastes à différentes lignées cellulaires cancéreuses pouvait diminuer considérablement la quantité de cellules nécessaires à la formation de tumeur (Picard *et al.*, 1986). Plus tard, le même groupe de recherche a réalisé des expériences de co-injection de cellules humaines de cancer prostatique faiblement tumorigènes avec différents fibroblastes chez la souris. Il est alors apparu que la formation de tumeur était induite différemment selon les fibroblastes : 62% avec des fibroblastes osseux humains, 31% avec des cellules embryonnaires mésenchymateuses de sinus urogénital de rat, 17% avec des fibroblastes prostatiques de rat et 0% avec des NIH-3T3, du rein normal de rat ou des fibroblastes pulmonaires humains (Gleave *et al.*, 1991). La co-injection de cellules de stroma ovarien normal s'avérait réduire significativement la croissance tumorale. Les cellules stromales n'étaient pas capables de survivre à long-terme dans la xénogreffe, et les cellules cancéreuses recrutaient plutôt un nouveau stroma d'origine murine (Parrott *et al.*, 2001). Dans une autre étude, différentes combinaisons de fibroblastes normaux et CAFs avec un épithélium normal de prostate et un épithélium initié (immortalisé avec SV-40T, non tumorigène) greffés dans du collagène ont révélé que seule la combinaison des CAFs avec les cellules épithéliales de prostate activées augmentait la population cellulaire épithéliale lors de l'inoculation à des souris (Olumi *et al.*, 1999). En combinant des cellules épithéliales mammaires humaines transformées avec des fibroblastes normaux, l'incidence des tumeurs doublait et la période de latence chez la souris était réduite (Elenbaas *et al.*, 2001). En utilisant une lignée cellulaire de cancer prostatique faiblement tumorigène dans des xénogreffes chez la souris, la fréquence de tumeurs visibles a pu être augmentée de 8% à 100% lorsque du matrigel et des cellules stromales primaires de prostate étaient ajoutées (Tuxhorn *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces données renforce l'idée que les fibroblastes et leur répertoire protéique sont impliqués dans tous les stades de développement tumoral, incluant l'initiation, la croissance tumorale, l'invasion locale et la dissémination métastatique, mais peut également inhiber la croissance tumorale.

### 5.2.2. Modèles transgéniques

Des modèles transgéniques fournissant un stroma modifié, avec l'absence d'un gène chez l'hôte, ont été développés. Par exemple, des souris déficientes pour la stromélysine-3 ont une tumorigenèse réduite après exposition à des agents carcinogènes. D'autre part, des chercheurs ont généré un modèle de souris transgéniques exprimant la protéine fluorescente verte GFP sous le contrôle du promoteur du VEGF. Après implantation syngénique d'une tumeur solide ou croisement avec une souche de souris développant spontanément des tumeurs mammaires, des fibroblastes fluorescents ont été retrouvés autour et infiltrant la masse tumorale. Ainsi, les CAFs représentent une source prédominante de VEGF, inducteur principal de l'angiogenèse chez ces souris (Fukumura *et al.*, 1998). Dans une étude plus récente, la lignée cellulaire de carcinome mammaire fortement métastatique CSML100 a été injectée à des souris déficientes pour le gène S100A4 (petite protéine de liaison au calcium aussi appelée FSP1 pour fibroblast specific protein), révélant un développement tumoral et une dissémination métastatique clairement retardée par rapport au contrôle chez des souris sauvages. La co-injection avec des fibroblastes exprimant S100A4 restaure la capacité carcinogène des cellules tumorales syngéniques (Grum-Schwensen *et al.*, 2005).

Dans les modèles améliorés, l'expression d'un gène peut être contrôlée de façon spécifique d'un tissu ou d'un type cellulaire (système Cre/lox). Certaines de ces approches moléculaires ont permis d'évaluer le rôle de gènes considérés comme importants dans les interactions tumeur-CAF, comme par exemple le TGF- $\beta$ . Dans une étude, des souris dans lesquelles le récepteur de type II du TGF- $\beta$  (*Tgfb2*) a été inactivé spécifiquement dans les fibroblastes stromaux ont été générées (*Tgfb2<sup>fspKO</sup>*) et 100% d'entre elles développaient une néoplasie prostatique intraépithéliale, précurseur présumé de carcinome prostatique, ainsi que des carcinomes des cellules squameuses de l'estomac à l'âge de six semaines (Bhowmick *et al.*, 2004 a). Les fibroblastes *Tgfb2<sup>fspKO</sup>* surexprimaient le facteur HGF et une augmentation de la phosphorylation activatrice de son récepteur c-Met a été trouvée dans les cellules de carcinome de l'estomac, suggérant que l'activation de la signalisation paracrine de l'HGF est un mécanisme potentiel de stimulation de la prolifération épithéliale. Le modèle de souris *Tgfb2<sup>fspKO</sup>* démontre que la voie de signalisation du TGF- $\beta$  connue pour supprimer la progression du cycle cellulaire et la formation tumorale quand elle agit sur les cellules épithéliales peut aussi inhiber indirectement la prolifération épithéliale quand elle agit sur les fibroblastes stromaux adjacents *in vivo*. En conséquence, la perte de cette voie dans les fibroblastes engendre une augmentation de la prolifération épithéliale et peut aussi favoriser la formation de carcinome invasif dans certains tissus.

## 6. Les implications cliniques des CAFs en thérapie anti-cancéreuse

Le nombre croissant d'études appréciant le rôle majeur des interactions entre les fibroblastes et les cellules cancéreuses soutient la validité de cibler la signalisation des CAFs dans la thérapie anticancéreuse. Les principales raisons sont : (1) les altérations des CAFs contribuent directement ou indirectement (via le microenvironnement) au processus de tumorigenèse ; (2) les cellules cancéreuses recrutent les fibroblastes et induisent des changements qui sont essentiels pour le développement tumoral ; et (3) les CAFs possèdent des propriétés uniques leur permettant de favoriser la croissance tumorale mais sont considérés comme génétiquement stables, limitant les risques de développer une résistance aux traitements. D'une manière générale, les approches thérapeutiques ciblant les CAFs peuvent être de deux sortes, la première visant à interférer avec les signaux pro-tumoraux dérivés des CAFs et la seconde s'attaquant à leur recrutement ou à leur expansion.

### 6.1. Interférence avec les signaux dérivés des CAFs

*HGF/c-Met* - L'**AMG 102** est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le facteur HGF/SF dont la tolérance a récemment été évaluée en phase II en combinaison avec le bevacizumab (Avastin®) chez des patients présentant des tumeurs solides (Rosen *et al.*, 2010). Bien que cette combinaison semble bien tolérée, des combinaisons de l'AMG 102 avec d'autres anti-angiogéniques doivent être encore évaluées. D'autres inhibiteurs de la voie HGF/c-Met ont été préparés pour évaluation clinique (pour revue (Christensen *et al.*, 2005)).

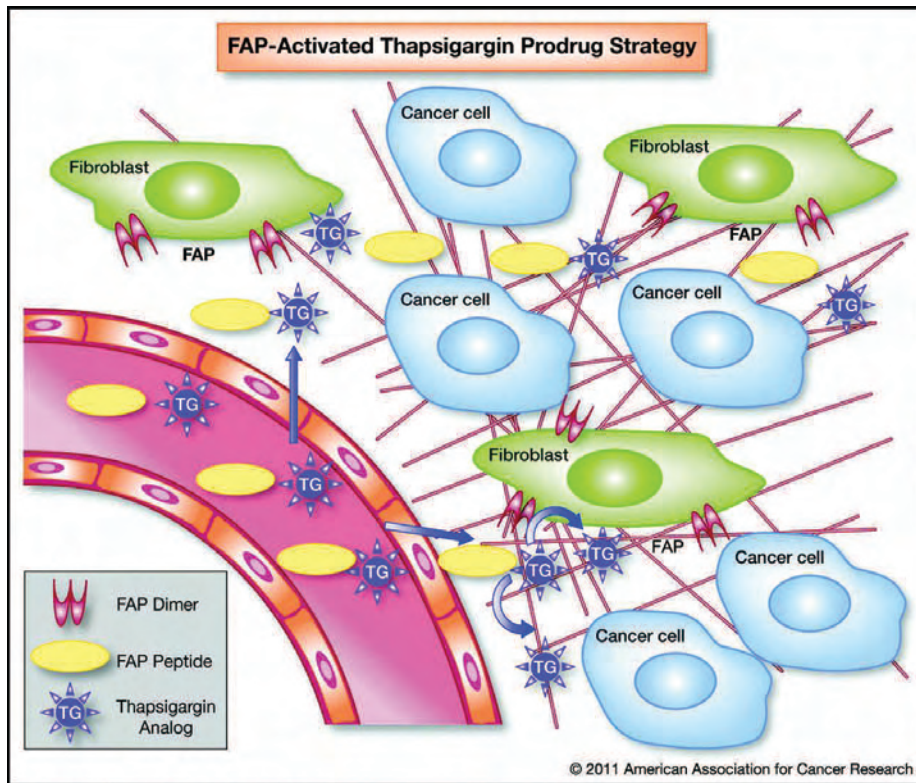
*FAP* - La sérine protéase liée à la membrane des fibroblastes activés FAP est une autre cible pharmacologique en essais cliniques. Un anticorps monoclonal humanisé, le **sibrotuzumab**, a été développé contre FAP et testé en phase I chez des patients avec des cancers avancés du colon ou des poumons puis en phase II sans résultat objectif, entraînant la suspension des études (Hofheinz *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2003). Des études évaluant les effets d'anticorps marqués par des radioisotopes ou des toxines sont aussi en cours de développement (pour revue (Brennen *et al.*, 2012)). Une autre approche thérapeutique est d'inhiber la fonction enzymatique de cette protéine. Des petites molécules inhibitrices basées sur l'acide boronique sont évaluées pour différents types de cancer. Le **Talabostat** inhibe sélectivement FAP et la dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV)/CD26, et stimule la production de cytokines et chimiokines immunomodulatrices par un mécanisme encore méconnu (Cunningham, 2007). Le Talabostat a été testé, en essais cliniques de phase II, seul ou en combinaison pour le traitement de cancer colorectal métastatique, de carcinome pulmonaire non à

petites cellules, de mélanome de stade IV et de leucémie lymphocytaire chronique (pour revue (Brennen *et al.*, 2012)). Cependant, aucun bénéfice clinique n'a pu être attribué au Talabostat.

Une autre stratégie probablement plus viable consisterait à tirer avantage de l'expression restreinte de FAP au niveau de la tumeur et d'utiliser son activité enzymatique pour délivrer des agents cytotoxiques dans le microenvironnement tumoral. Ainsi, des pro-drogues alliant un agent cytotoxique à un site de clivage spécifiquement reconnu par FAP pourraient être administrées sous forme inactive par voie systémique et leur activation protéolytique par FAP s'effectuerait au contact des CAFs dans le microenvironnement tumoral. La cytotoxine non spécifique en elle-même entraînerait la mort de l'ensemble des cellules à proximité, augmentant ainsi l'effet anti-tumoral. Sur ce principe, une protoxine activée par FAP a été générée à partir de venin d'abeille et les résultats ont montré un effet anti-tumoral sur des xénogreffes de cancers mammaire et prostatique (LeBeau *et al.*, 2009). Le même groupe a également développé des pro-drogues basées sur la thapsigargine, molécule extraite de la plante *Thapsia garganica*, qui ont démontré une inhibition de croissance tumorale dans les mêmes modèles de xénogreffes (pour revue (Brennen *et al.*, 2012)) (Figure 15). Ces résultats encourageants corroborent l'idée de cibler FAP dans les stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses.

**Intégrines** - Les intégrines, récepteurs d'adhésion cellulaire régulant la migration, l'invasion et la prolifération, contribuent largement à la progression tumorale et sont des cibles attractives pour la thérapie anti-cancéreuse. L'**etaracizumab** (Abegrin®), antagoniste de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , le **CNT095**, anticorps monoclonal spécifique  $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ , le **cilengitide**, petite molécule inhibitrice de  $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$  et le **volociximab**, anticorps monoclonal bloquant la fonction de l'intégrine  $\alpha_v\beta_1$  sont actuellement en phase II/III d'essais cliniques (Desgrosellier and Cheresch, 2010). L'intégrine  $\alpha_v\beta_1$  joue un rôle particulièrement important dans les effets tumorigènes des CAFs, et cibler cette intégrine mésenchymateuse pourrait avoir un impact important sur le microenvironnement tumoral. Le blocage de la signalisation des intégrines  $\beta_1$  participerait en partie à la normalisation du stroma, aboutissant au ralentissement voire à la suppression de la progression tumorale (pour revue (Mueller and Fusenig, 2004)).

**MMP** - De nombreuses études ont montré que l'expression des MMPs était corrélée à la transformation maligne, les métastases et la diminution de survie des patients, faisant des MMPs des cibles thérapeutiques très attractives. Actuellement, il n'y a aucun inhibiteur de MMP utilisé en clinique pour le traitement de cancer. En effet, plusieurs inhibiteurs antinéoplasiques de MMP à spectre large ont été testés ; le **Marimastat**, son analogue le **Batimastat**, le **Tanomastat** et le **Prinomastat** ont été utilisés en phase III d'essais cliniques pour des cancers pancréatiques,



**Figure 15 - Schéma de la stratégie d'activation de prodrogue par FAP (Brennen *et al.*, 2012).**

Une prodrogue activable par FAP est administrée par voie systémique et circule dans le corps sous forme inactive. Celle-ci diffuse dans le microenvironnement tumoral où elle rencontre les CAFs exprimant FAP qui active sélectivement la cytotoxine par clivage du peptide inactivateur contenant la séquence de reconnaissance par FAP. Une fois activée, l'analogue de thapsigargine utilisé dans cet exemple tue directement les cellules exprimant FAP et cible également les cellules avoisinantes et les cellules endothéliales par effet bystander. En théorie, n'importe quel agent cytotoxique peut être utilisé dans cette stratégie pourvu que sa structure lui permette d'être conjugué à un substrat peptidique accessible par la protéase. TG, thapsigargine.

prostatiques et pulmonaires, mais sans amélioration significative de survie des patients, entraînant la suspension des essais. Cependant, dans ces essais, les inhibiteurs ont été testés chez des patients présentant des stades avancés de maladies, en désaccord avec les études précliniques qui préconisaient leur utilisation seulement dans des stades précoces de cancer afin qu'ils soient efficaces. Les efforts actuels visent à développer des inhibiteurs plus sélectifs de MMP (Tu *et al.*, 2008).

*Autres protéases* - Au-delà des inhibiteurs de MMP, des inhibiteurs d'autres protéases telles que les cathepsines et l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) sont en cours d'étude, mais aucun d'entre eux n'est en essai clinique pour le mélanome. Les cathepsines B, K et L ainsi que l'uPA et son récepteur uPAR semblent surexprimés dans le mélanome et les cellules stromales et contribuent à l'invasion cellulaire. D'autres études sont donc nécessaires pour valider le rôle de ces protéases dans la formation de mélanome.

Plusieurs stratégies ont tenté de cibler le système uPA, notamment en inhibant l'expression de composants de ce système, en inhibant l'activité de la plasmine, uPA ou PAI-1 ou en inhibant l'interaction uPA/uPAR (Ulisse *et al.*, 2009). La petite molécule inhibitrice de l'uPA **WX-671** disponible oralement est actuellement en phase II pour des patients avec un cancer du sein métastatique et un antagoniste peptidique non compétitif de l'interaction uPA/uPAR appelé **A6** est en phase I pour des cancers gynécologiques. La **Suramine** est un compétiteur de l'uPA approuvé comme antiparasitaire et a été testée en essais cliniques pour différentes tumeurs solides sans montrer d'activité anti-tumorale significative (Ulisse *et al.*, 2009).

## **6.2. Interférence avec le recrutement et l'expansion des CAFs**

*PDGF* - Plusieurs inhibiteurs des récepteurs tyrosine-kinase au PDGF sont utilisés en routine en clinique. L'**imatinib** (Glivec®), le **sorafenib** (Nexavar®) et le **sunitinib** (Sutent®) sont actuellement utilisés respectivement pour le traitement de patients avec des tumeurs stromales gastro-intestinales et des leucémies myéloïdes chroniques, des carcinomes des cellules rénales et des carcinomes hépatocellulaires, ainsi que des carcinomes des cellules rénales et des tumeurs stromales gastro-intestinales résistantes à l'imatinib. Récemment, la FDA a approuvé le **pazopanib** (Votrient®), un inhibiteur multi-cibles de récepteurs tyrosine kinase contre PDGFR $\alpha/\beta$ , VEGFR-1, -2, -3 et c-kit, pour le traitement de patients avec des carcinomes des cellules rénales (LaPlant and Louzon, 2010). Ils ont notamment été validés pour le ciblage des cellules cancéreuses, mais peuvent tout aussi cibler naturellement le PDGFR sur les CAFs.

*TGF-β* - L'inhibition du TGF-β dans les cellules cancéreuses humaines ou murines augmente la cytotoxicité de plusieurs agents chimiothérapeutiques en réponse à des radiations ionisantes (pour revue (Drabsch and Ten Dijke, 2012)). Par exemple, le traitement de cellules de cancer mammaire avec des anticorps anti-TGF-β augmente la fragmentation de l'ADN induite par le *cis*-platine et peut restaurer la sensibilité de cellules résistantes au *cis*-platine (Ohmori *et al.*, 1998). Cette restauration de sensibilité peut être induite par des anticorps neutralisants ou par un inhibiteur du TGF-β. L'activité du TGF-β induite par les radiations est impliquée dans les toxicités tissulaires tardives, limitant l'utilisation de la radiothérapie pour le traitement du cancer. Chez certains individus, une fibrose peut se développer plusieurs années après la thérapie, résultant de cascades de cytokines aberrantes principalement initiées par le TGF-β (pour revue (Lan, 2011)). Ainsi, l'activation du TGF-β serait un effet indésirable de la radiothérapie, suggérant l'intérêt de son inhibition lors de radio- et chimiothérapies. Des inhibiteurs de la voie du TGF-β sont en cours d'évaluation dans des tests précliniques ainsi que dans quelques essais cliniques, y compris pour le traitement du mélanome (Tableau 5).

Stage	Drug	Type	Target	Cancer type	Clinical trial identifier
Phase 1	AP12009 (Trabedersen)	AON	TGF-β2	Multiple cancers	NCT00844064
	LY2157299	Kinase inhibitor	ALK5	Multiple myeloma	NCT00689507
	LY573636	Kinase inhibitor	ALK5	Hematopoietic malignancies	NCT00718159
	TAG Vaccine	Vaccine therapy	TGF-β2 & immune response	Multiple cancers	NCT00684294
Phase 1/2	LY2157299	Kinase inhibitor	ALK5	Glioma	NCT01220271
Phase 2	LY2157299	Kinase inhibitor	ALK5	Hepatocellular carcinoma	NCT01246986
	LY573636	Kinase inhibitor	ALK5	Melanoma	NCT00383292
	LY573636	Kinase inhibitor	ALK5	Non-small cell lung carcinoma	NCT00363766
	GC1008	Antibody	TGF-β2	Kidney cancer	NCT00899444
	GC1008	Antibody	TGF-β2	Malignant pleural mesothelioma	NCT01112293
Phase 3	AP12009 (Trabedersen)	AON	TGF-β2	Glioma	NCT00761280
	Lucanix (belagen-pumatumucel)	Vaccine therapy	TGF-β2 & immune response	Non-small cell lung carcinoma	NCT000676507
Preclinical	AP11014	AON	TGF-β1	Multiple cancers	
	LY2109761	Kinase inhibitor	ALK5/TGFBRII	Pancreatic cancer	
	SD208	Kinase inhibitor	ALK5	Melanoma	
	SM16	Kinase inhibitor	ALK5	Multiple cancers	
	TGFBRII Antibody	Antibody	TGFBRII	Multiple cancers	
	sTGFBRII (Fc)	Ligand Trap	TGFBRII	Multiple cancers	
	sBetaglycan	Ligand Trap	Betaglycan	Multiple cancers	

**Tableau 5 - Ciblage du TGF-β dans le cancer : composés en essais cliniques et précliniques (Drabsch and Ten Dijke, 2012)**

Une des approches consiste à inhiber l'activité kinase du récepteur TGF $\beta$ R1 ou TGF $\beta$ R2, visant à empêcher la phosphorylation des effecteurs en aval, tels que les récepteurs associés aux SMADs (R-SMADs). Le **LY2109761**, un double inhibiteur de kinase ALK5/TGF $\beta$ R2, inhibe respectivement la capacité de formation de tumeur et d'invasion de cellules initiatrices de gliome et de cellules de carcinome hépatocellulaire. De plus, le blocage de l'activité kinase contribuerait à la régression tumorale en supprimant les effets immunosuppresseurs du TGF- $\beta$ . Des études précliniques ont mis en évidence que la combinaison d'un transfert adoptif de cellules T CD8<sup>+</sup> avec un inhibiteur de kinase ALK-5 pouvait réduire la croissance de tumeurs solides (Wallace *et al.*, 2008).

Toutefois, le double rôle du TGF- $\beta$  dans la tumorigenèse complique l'utilisation d'inhibiteurs. Bien que ces traitements puissent réduire la tumeur en question, ils peuvent potentiellement stimuler des tumeurs occultes ou bien établir un cancer *de novo* dû à l'inhibition de la suppression de tumeur. Des études précliniques ont donc examiné des molécules anti-sens ou des anticorps monoclonaux dirigés contre différents membres de la famille du TGF- $\beta$ . Une autre stratégie a utilisé des vecteurs d'expression anti-sens du TGF- $\beta$  introduits dans les cellules tumorales et s'avère prometteuse dans les études vaccinales précliniques (pour revue (Drabsch and Ten Dijke, 2012)).

Le concept de cibler des protéines dérivées de CAFs fait maintenant partie du courant dominant dans la recherche de nouveaux traitements contre le cancer. Il est probable que dans un futur proche une combinaison des différentes approches permettra d'accéder à un plus grand nombre de cibles médicamenteuses dans la lutte contre le cancer.



### III. LES SPHINGOLIPIDES

#### 1. Généralités

Les sphingolipides (SLs) ont été nommés ainsi par J.L.W.Thudichum en 1884 en raison de leur nature complexe évoquant un sphinx, animal énigmatique de la mythologie grecque. La vision de ces lipides aux diverses structures et fonctions a considérablement évolué au cours de ces vingt dernières années. Longtemps considérés comme de simples éléments structurant les membranes cellulaires, ils sont maintenant reconnus comme des lipides bioactifs jouant un rôle central dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation, la migration, l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose (Bartke and Hannun, 2009).

#### 1.1. Structure

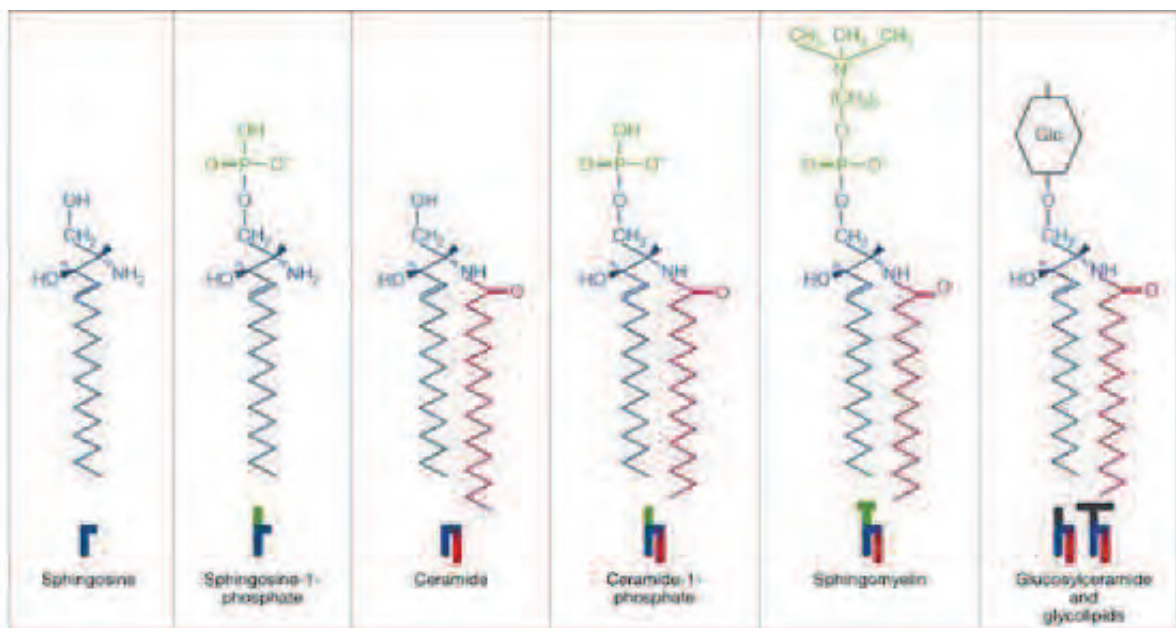


Figure 16 - Structure des principaux sphingolipides (Futerman and Hannun, 2004).

Les SLs constituent une classe de lipides dont la structure est caractérisée par une base sphingoïde composée de 18 atomes de carbone et d'une fonction amino-alcool. Ils sont synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique (RE) à partir de précurseurs non sphingolipidiques. Cette base sphingoïde résulte de la condensation d'une sérine avec un palmitoylCoA, elle peut être saturée (dihydrosphingosine ou sphinganine) ou insaturée (sphingosine), et subir des modifications pour donner des sphingolipides plus complexes (Figure 16). Par exemple, la phosphorylation du groupe hydroxyl en C1 par une sphingosine kinase conduit à la formation de dihydrosphingosine 1-phosphate ou de sphingosine 1-phosphate (S1P) respectivement, qui sont d'importantes molécules

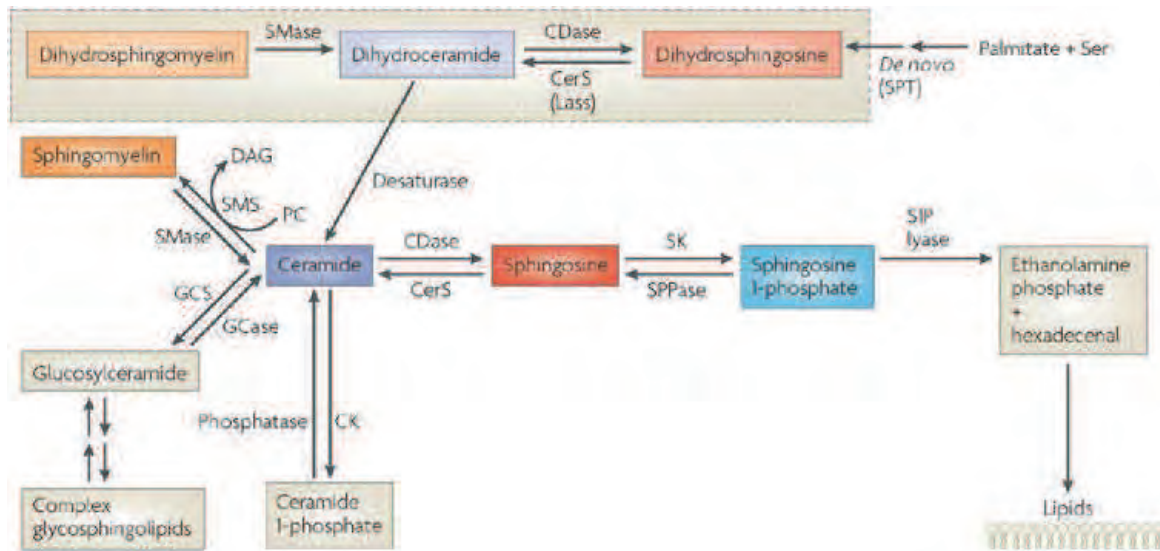
biologiquement actives. D'autre part, l'acylation de la sphingosine par un acide gras plus ou moins long donne lieu au composé central du métabolisme des sphingolipides appelé céramide. Compte tenu de la diversité des chaînes d'acides gras qui peuvent être fixées et des différentes fonctions qu'elles engendrent, on parle d'une classe de molécules de céramides plutôt que d'une seule molécule. Il s'agit de molécules clés dans la signalisation cellulaire et servent de précurseurs pour la formation de sphingolipides plus complexes, via la substitution du groupe hydroxyl en C1. L'ajout d'un groupement phosphate par une céramide kinase génère du céramide 1-phosphate (C1P), la condensation avec une phosphocholine conduit à la formation de sphingomyéline (SM) et les glycosphingolipides (GSLs) résultent de l'addition de résidus de glucose ou galactose, générant respectivement du glucosylcéramide (GlcCer) et du galactosylcéramide (GalCer) (pour revue (Gault *et al.*, 2010)).

Comme tous les lipides membranaires, les SLs sont des molécules amphiphiles, avec des propriétés à la fois hydrophiles et hydrophobes à différents degrés leur permettant de diffuser à travers les membranes. La région apolaire hydrophobe est constituée des chaînes carbonées de la base sphingoïde et de l'acide gras qui y est fixé, et la tête polaire hydrophile consiste en un groupement phosphate (S1P et C1P), phosphorylcholine (SM), ou des sucres (GSLs), le céramide ayant la région hydrophile minimale consistant en ses deux groupements OH.

Les SLs sont présents dans de nombreux organismes comme la levure, les insectes, les vers, les poissons et les mammifères. Ils représentent la classe majeure des lipides membranaires ubiquitaires chez les eucaryotes et sont retrouvés dans différents compartiments subcellulaires ou dans les liquides biologiques pour quelques-uns. Bien qu'ubiquitaires, leur proportion varie selon le tissu et le type cellulaire.

## **1.2. Métabolisme et localisation subcellulaire**

On distingue deux voies métaboliques menant à la génération de céramide : la voie de synthèse *de novo* et la voie de recyclage par hydrolyse de la SM (Figure 17).



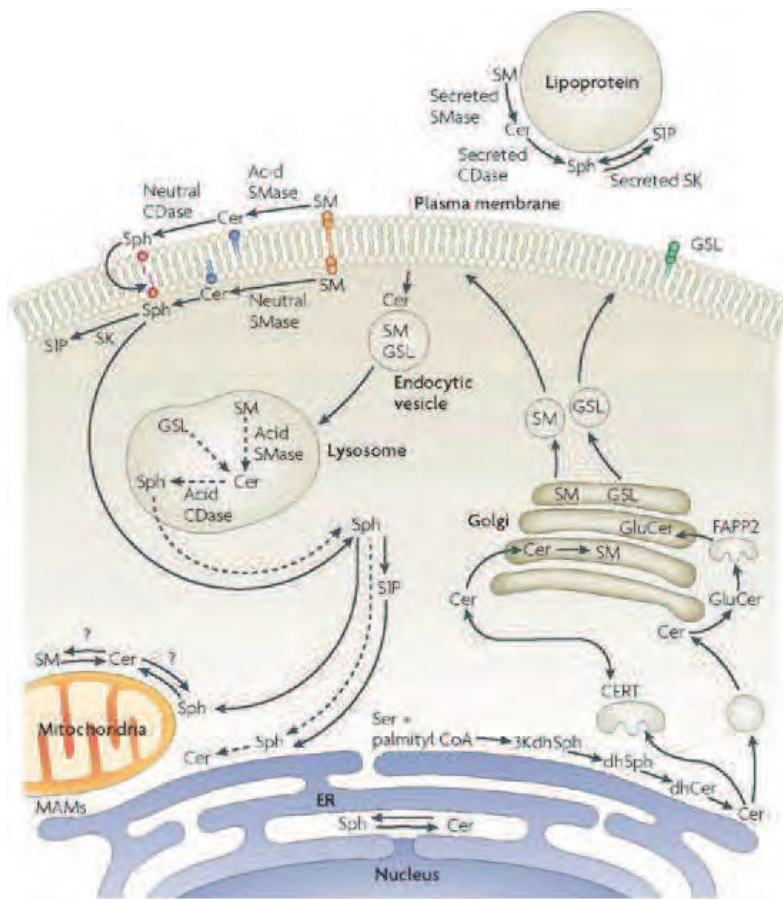
**Figure 17 - Métabolisme des sphingolipides** (Hannun and Obeid, 2008).

CDase, céramidase; CK, céramide kinase; DAG, diacylglycérol; GCase, glucosyl céramidase; GCS, glucosylcéramide synthase; PC, phosphatidylcholine; SK, sphingosine kinase; SMase, sphingomyélinase; SMS, sphingomyéline synthase; SPPase, sphingosine phosphate phosphatase; SPT, sérine palmitoyl transférase

La biosynthèse *de novo* est initiée par la condensation d'une sérine avec un palmitoylCoA catalysée par la sérine palmitoyltransférase (SPT) sur la face cytosolique du RE. La 3-cétosphinganine ainsi formée va être réduite en sphinganine (ou dihydrosphingosine) par la cétosphinganine réductase puis acylée par une dihydrocéramide synthase. Le dihydrocéramide subit ensuite une oxydation par une désaturase pour générer du céramide. La suite des réactions consiste principalement à transférer un groupe phosphocholine à partir d'une phosphatidylcholine sous l'action de SM synthases pour générer de la SM et du diacylglycérol. Le céramide peut également être phosphorylé par une céramide kinase, puis recyclé par une C1P phosphatase ou glycosylé par des glucosyl ou galactosyl céramide synthases.

Concernant la voie de recyclage, elle est catalysée par des sphingomyélinases (SMases) qui clivent la SM pour libérer de la phosphocholine et du céramide. Différentes SMases neutres, acide ou alcaline sont distinguées selon leur localisation subcellulaire et leur pH optimum d'activation. Il a également été décrit que la dégradation de glycosphingolipides sous l'action d'hydrolases représentait une source importante de céramide (pour revue (Bartke and Hannun, 2009)).

Bien que la synthèse *de novo* du céramide ait lieu au niveau du RE, sa conversion en métabolites sphingolipidiques plus complexes se déroule dans des compartiments cellulaires différents (sauf pour le GalCer) et principalement au niveau de l'appareil de Golgi (Figure 18).



**Figure 18 - Compartimentalisation des enzymes et métabolites de la voie des sphingolipides** (Hannun and Obeid, 2008).

3KdhSph, 3-keto-dihydrosphingosine; dhCer, dihydrocéramide; dhSph, dihydrosphingosine; S1P, sphingosine-1-phosphate.

Deux voies spécifiques sont connues pour transporter le céramide du RE au Golgi : la première fait intervenir la protéine de transport CERT et est impliquée dans la formation de SM (Hanada *et al.*, 2003). La seconde passe par un transport vésiculaire et permet la synthèse de GlcCer, qui est ensuite délivré dans la lumière du Golgi pour servir de précurseur pour la synthèse de glycosphingolipides complexes, les gangliosides. Ces produits néosynthétisés sont ensuite transportés à la membrane plasmique par le trafic vésiculaire. La SM peut être métabolisée en céramide et par conséquent en d'autres lipides bioactifs, soit par la SMase acide sur le feuillet externe de la membrane soit par la SMase neutre qui réside dans le feuillet interne de la bicouche lipidique. Ce céramide est dégradé par des céramidases en sphingosine qui pourra être phosphorylée par les sphingosine kinases (SK) localisées dans le cytosol et donner de la sphingosine 1-phosphate (S1P). Celle-ci peut être recyclée en sphingosine sous l'action de S1P phosphatases (SPP) ou être dégradée de façon irréversible en hexadécénal et phosphoéthanolamine par la S1P lyase (SPL), enzyme de sortie du métabolisme des sphingolipides. Par ailleurs, la voie endosomale permet la recirculation des SLs à partir de la membrane plasmique. Ainsi, la SM et le GlcCer sont métabolisés en

céramide dans le compartiment lysosomal par les SMases et les glucosidases puis le céramide est dégradé par une céramidase acide pour former de la sphingosine (Sph). Celle-ci serait capable de sortir du lysosome et de rejoindre le RE pour être recyclée.

## 2. Les sphingolipides : des lipides bioactifs

Les SLs sont des lipides membranaires qui ont des rôles structuraux importants, ils régulent la fluidité de la bicouche lipidique et sont impliqués plus particulièrement au niveau de microdomaines appelés rafts lipidiques. Depuis les années 1980, les SLs ont émergé comme étant une nouvelle classe de médiateurs lipidiques impliqués dans la régulation de nombreux processus biologiques. Au sein de cette grande famille, le céramide et la S1P sont les plus largement étudiés. La concentration cellulaire en céramide est jusqu'à 30 fois supérieure à celle de la sphingosine, elle-même 100 fois plus élevée que celle de la S1P (pour revue (Hannun and Obeid, 2008)). Ainsi, un faible changement de céramide peut avoir des effets drastiques sur les taux de sphingosine et S1P. Les relations métaboliques entre ces trois composés sont d'une grande importance dans la détermination du comportement et du devenir cellulaire, signifiant leur intérêt thérapeutique. Il est généralement reconnu que le céramide et la sphingosine s'opposent aux actions de la S1P et la modulation de leurs taux intracellulaires entraîne des effets opposés sur la fonction et la survie cellulaires. Ainsi, la notion d'un "rhéostat sphingolipidique" a été proposée, mettant en avant l'importance du ratio entre céramide/sphingosine et S1P intracellulaires dans les effets biologiques engendrés (Figure 19).



**Figure 19 - Rhéostat sphingolipidique** (Spiegel and Milstien, 2003).

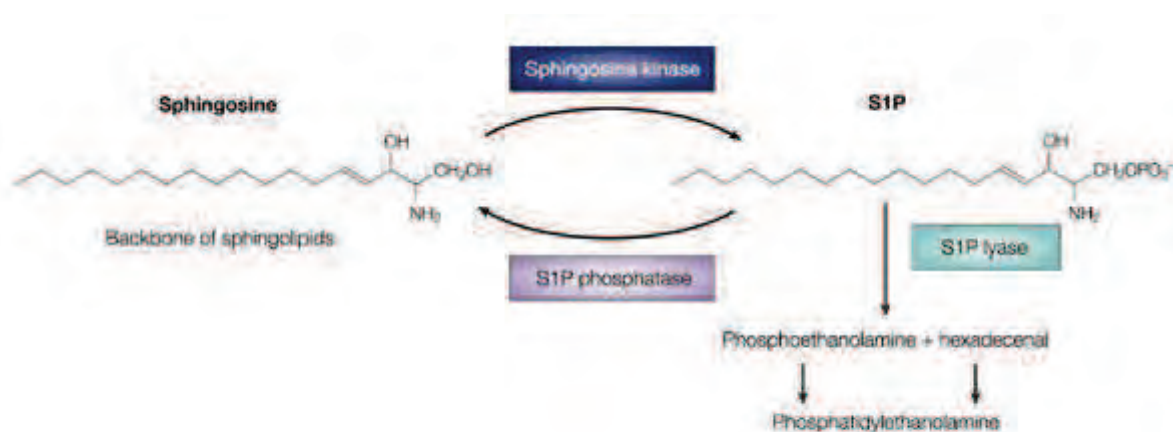
La S1P, la sphingosine et le céramide sont des métabolites sphingolipidiques interconvertibles. Des stimuli externes peuvent activer les sphingosine kinases (SKs) qui convertissent la sphingosine en S1P, favorisant ainsi la croissance cellulaire et la survie. De plus, la S1P régule plusieurs processus en interagissant avec ses récepteurs spécifiques à la surface cellulaire (S1PR1-5). À l'inverse, les S1P phosphatases (SPPs) déphosphorylent la S1P pour former de la sphingosine, qui est alors N-acylée pour donner du céramide. Le céramide et la sphingosine ont été associés à l'arrêt de croissance et à l'apoptose.

La signalisation du céramide est communément associée à l'arrêt de croissance cellulaire, aux processus de quiescence et sénescence, mais aussi à la mort cellulaire sous ses différentes formes (apoptose, nécrose, autophagie) (pour revue (Ogretmen and Hannun, 2004; Ségui *et al.*, 2006)). De même, la sphingosine est impliquée dans l'induction d'arrêt du cycle cellulaire et dans l'apoptose en modulant des protéine kinases et d'autres voies de signalisation. Les effets plutôt "suppresseurs de tumeur" de ces métabolites s'opposent à ceux de la S1P, qui est un lipide "promoteur de tumeur". La S1P a des effets positifs sur la régulation de la prolifération, la croissance, la survie, la migration, l'inflammation, l'angiogenèse, la vasculogenèse et la résistance à la mort apoptotique et par conséquent antagonise les effets du céramide (pour revue (Spiegel and Milstien, 2003)). L'action de la S1P passe en partie par des récepteurs membranaires couplés aux protéines G (les S1PRs) présents à la surface cellulaire, entraînant la régulation de différentes voies de signalisation intracellulaires.

La suite de ce chapitre s'intéressera principalement à ce métabolite lipidique encore énigmatique qu'est la S1P.

## 2.1. Le métabolisme de la S1P

Comme pour toute molécule de signalisation, les taux extra- et intracellulaires de S1P sont faibles et finement régulés de façon spatio-temporelle par l'équilibre entre sa synthèse et sa dégradation, maintenu par trois enzymes : la sphingosine kinase (SK), la sphingosine 1-phosphate phosphatase (SPP) et la sphingosine 1-phosphate lyase (SPL) (Figure 20).



**Figure 20 - Métabolisme de la S1P** (Spiegel and Milstien, 2003).

Les principales enzymes de formation et de dégradation de la S1P sont représentées. Les sphingosine kinases catalysent la formation de S1P à partir de sphingosine. Inversement, deux classes d'enzymes, les S1P-phosphatases et la S1P lyase, dégradent la S1P. Les produits de la lyase, hexadécenal et phosphoéthanolamine, sont réutilisés pour la synthèse de phosphatidyléthanolamine.

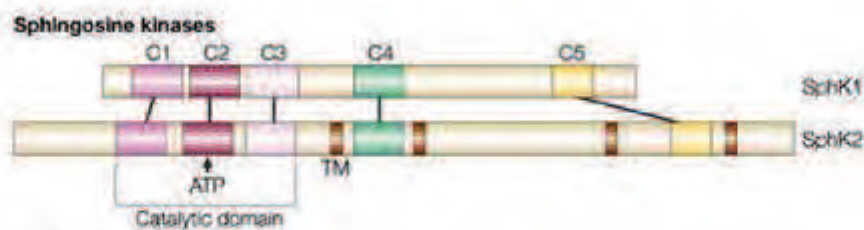
### 2.1.1. Synthèse de la S1P : les sphingosine kinases

Bien que, dans le plasma, l'hydrolyse de sphingosylphosphorylcholine par l'autotaxine (ou lysophospholipase D) puisse produire de la S1P, la génération de ce sphingolipide semble provenir essentiellement de la phosphorylation de sphingosine par les sphingosine kinases (SK). Les SKs représentent des enzymes clés du métabolisme des sphingolipides, situées au centre d'un carrefour entre céramide, sphingosine et S1P.

#### 2.1.1.1. Caractéristiques structurales et fonctionnelles des SKs

Deux isoenzymes fortement homologues de sphingosine kinase, SK1 et SK2, ont été caractérisées. Dans le génome humain, le gène SPHK1 est localisé sur le chromosome 17 (17q25.2) et le gène SPHK2 sur le chromosome 19 (19q13.2). Plusieurs variants d'épissage différant par leurs séquences N-terminales ont été identifiés pour chacune des enzymes. Chez l'homme, au moins trois variants de SK1 (SK1a, SK1b et SK1c) et deux de SK2 (SK2a et SK2b ou SK2-S et SK2-L) ont été répertoriés (pour revue (Alemany *et al.*, 2007)). Les deux enzymes catalysent la phosphorylation ATP-dépendante de la sphingosine et de la dihydrosphingosine, et la SK2 a une spécificité de substrat plus large avec la phytosphingosine et le FTY720, analogue de la sphingosine.

La SK1 a été purifiée pour la première fois à partir de rein de rat et identifiée comme une protéine de 49 kDa (Olivera *et al.*, 1998). La forme humaine de SK1 a été purifiée à partir de placenta et des comparaisons de séquences ont montré une forte homologie avec la forme murine (Melendez *et al.*, 2000; Nava *et al.*, 2000; Pitson *et al.*, 2000). Les formes humaines et murines de la seconde isoforme SK2 ont été clonées par homologie de séquence avec la SK1 murine. Bien que très homologue à SK1, SK2 possède une séquence de 240 acides aminés supplémentaires localisés en N-terminal et au centre de la protéine (Liu *et al.*, 2000 a) (Figure 21).



**Figure 21 - Structure schématique des sphingosine kinases** (Spiegel and Milstien, 2003). SphK1 et SphK2 ont cinq domaines conservés (C1-5) avec un domaine catalytique unique (C1-C3), le site de liaison à l'ATP étant localisé dans le domaine C2. TM : domaine transmembranaire.

Les SKs sont très conservées dans l'évolution et ont été identifiées dans de nombreux organismes comme les plantes, les levures, les vers, des insectes et les rongeurs. D'un point de vue structural, cinq domaines conservés (C1-C5) ont été identifiés au sein des SKs. Un unique domaine catalytique DAG kinase est contenu dans les domaines C1-C3, avec le site de liaison à l'ATP situé dans le domaine C2. Ce domaine catalytique est retrouvé dans les DAG kinases et la céramide kinase, contrairement au domaine C4 qui semble être spécifique des SKs. Par analyse de séquences, aucune région transmembranaire n'a été identifiée pour SK1 alors que quatre ont été prédites pour SK2.

D'un point de vue fonctionnel, SK1 est connue pour promouvoir la croissance cellulaire alors que SK2 semble l'inhiber et favoriser l'apoptose. Malgré ces différences, les fonctions de SK1 et SK2 sont au moins en partie redondantes puisque les souris déficientes pour l'une ou l'autre des isoformes ont des taux de S1P relativement proches de la normale et ne présentent pas de phénotype sévère. Par contre, la double déficience pour SK1 et SK2 est létale embryonnaire chez la souris à cause d'une maturation incomplète du système vasculaire et d'importants défauts musculaires et neuronaux (cf chapitre de livre en annexe et (Sabourdy *et al.*, 2008)).

#### **2.1.1.2. Localisation des SKs**

##### **a) Localisation tissulaire**

Chez les mammifères, SK1 et SK2 ont une distribution tissulaire différente. Des analyses de northern blot et de PCR quantitative ont révélé que, chez la souris, l'expression de SK1 était élevée au septième jour du développement embryonnaire puis diminuait, alors que l'expression de SK2 augmentait graduellement jusqu'au 17<sup>ème</sup> jour (Liu *et al.*, 2000 a). Dans les tissus adultes, l'expression de SK1 est plus élevée dans les poumons, la rate, le rein et le sang alors que SK2 est trouvée préférentiellement dans le foie, le rein, le cerveau et le cœur (Billich *et al.*, 2003; Kihara *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2000 a). Cependant, l'activité SK peut être mesurée dans tous les tissus de la souris (Billich *et al.*, 2003; Fukuda *et al.*, 2003).

##### **b) Localisation subcellulaire**

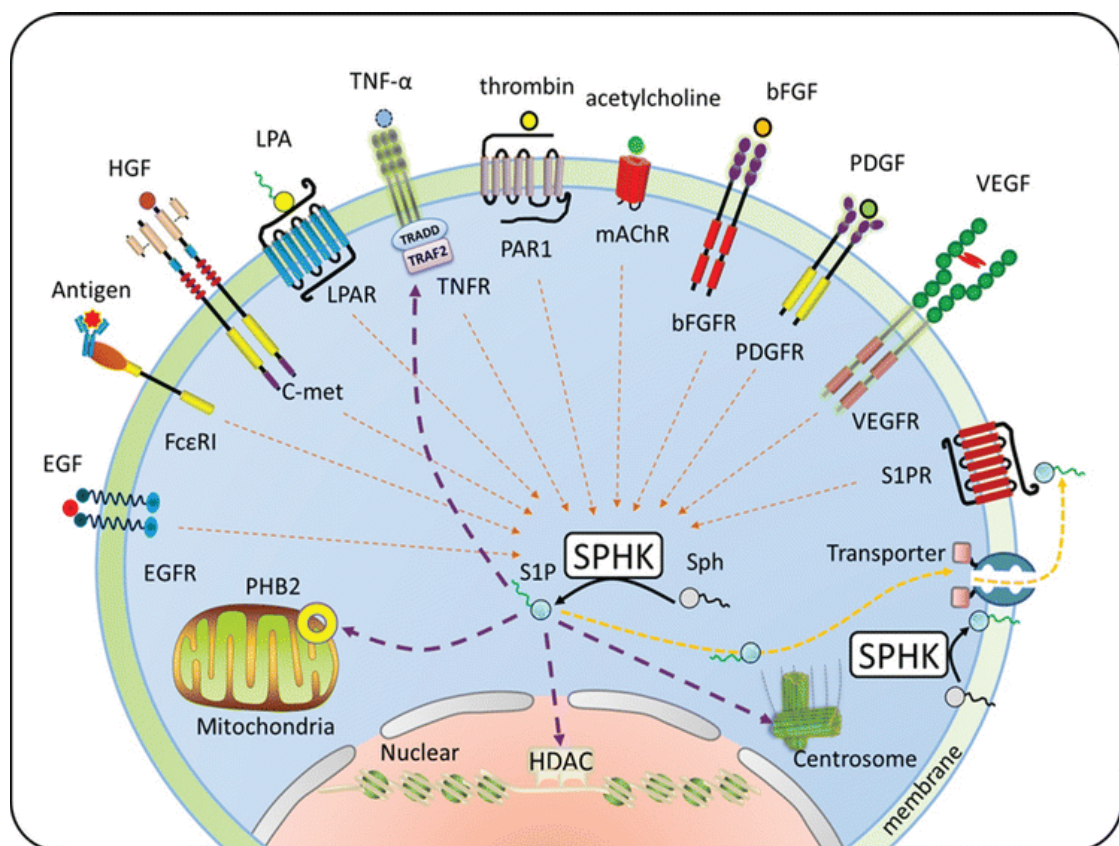
La localisation cellulaire des SKs diffère selon les isoformes, les divers variants et leur état d'activation. Chez la souris, la SK1a serait cytosolique alors que la SK1b, palmitoylée, serait localisée à la membrane plasmique. Il en est de même chez l'homme, avec la SK1c associée à des compartiments vésiculaires. Cependant, suite à son activation, la SK1 est transloquée à la membrane plasmique. Une étude a également détecté la SK1 dans le milieu extracellulaire (Ancellin *et al.*, 2002). Concernant la SK2, sa séquence de localisation nucléaire (NLS) lui confère une localisation prédominante au sein du noyau, mais elle peut également être retrouvée dans le cytoplasme en



réponse à la phosphorylation de sa séquence d'export nucléaire sur les résidus Ser 383 ou Ser 385 par la PKD ((Ding *et al.*, 2007), pour revue (Wattenberg, 2010)). De plus, sa localisation semblerait varier selon le type cellulaire et les conditions, avec une augmentation au niveau du RE lors de privation en sérum et une diminution dans le noyau après activation de PKC (Ding *et al.*, 2007; Maceyka *et al.*, 2005). Les mécanismes moléculaires régulant sa localisation au RE sont inconnus mais il semblerait que la région N-terminale de la protéine, différente de celle de SK1, soit importante dans ce processus (Don and Rosen, 2009).

### 2.1.1.3. Régulation de l'activité des SKs

L'activité des SKs est modulée par de nombreux facteurs (Figure 22).



**Figure 22 - Les sphingosine kinases (SPHK) sont stimulées par une large variété de facteurs (Liu *et al.*, 2012).**

La stimulation de SPHK entraîne la production de S1P à partir de sphingosine dans la membrane cellulaire, le cytoplasme ou le noyau. La S1P peut aussi agir comme stimulus intracellulaire de liaison à HDAC, TRAF2, prohibitine 2 et au centrosome. La S1P est transférée du milieu intracellulaire au milieu extracellulaire par des transporteurs protéiques. La S1P se lie à ses récepteurs et stimule SPHK de façon autocrine ou paracrine. De plus, une forme sécrétée de SPHK pourrait produire de la S1P dans le milieu extracellulaire. HDAC, histone déacétylases; PHB, prohibitine 2; TRAF2, TNF receptor-associated factor 2; EGF, epidermal growth factor; HGF, hepatocyte growth factor; PDGF, platelet-derived growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; bFGF, basic fibroblast growth factor, TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; LPA, lysophosphatidic acid; Fc $\epsilon$ RI, Fc receptor; IgE hepatocyte growth factor receptor; PAR1, protease-activated receptor 1; mAChR, muscarinic acetylcholine receptor

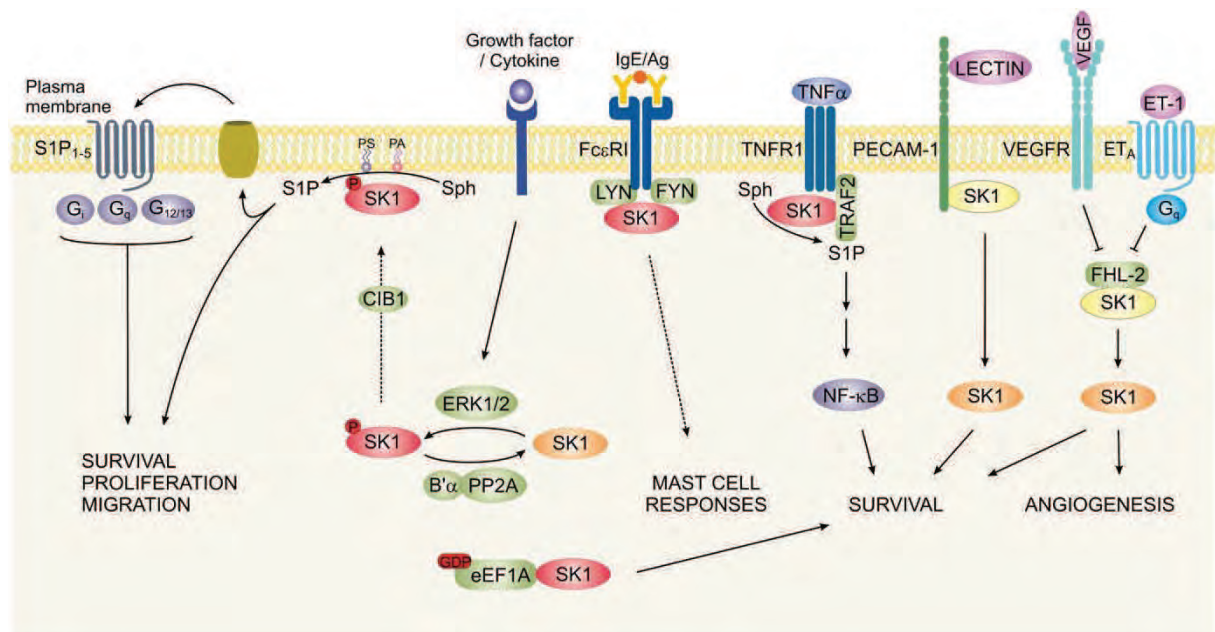
### **2.1.1.3.1. SK1 : activation**

L'activation de SK1 se ferait en deux phases : la première phase est rapide (quelques minutes) et transitoire, impliquant des modifications post-traductionnelles qui augmentent son activité enzymatique et sa translocation à la membrane plasmique ; la seconde phase a lieu au cours des 24h suivantes par augmentation de sa transcription (Nakade *et al.*, 2003).

#### **a) Activation post-traductionnelle**

De nombreux stimuli, incluant des facteurs de croissance, des hormones, des chimiokines et des cytokines, sont capables d'activer la SK1 (Figure 22). Il s'agit notamment de ligands à des récepteurs couplés aux protéines G comme l'acétylcholine, la prosaposine, l'acide phosphatidique, le peptide formylméthionine, la S1P elle-même et encore d'autres facteurs (pour revue (Maceyka *et al.*, 2002)). Des agonistes de récepteurs aux facteurs de croissance de type tyrosine kinases entraînent également l'activation de SK1, comme le PDGF, le NGF et l'EGF. C'est aussi le cas des récepteurs aux immunoglobulines FcγRI, FcγRIII, FcεRI et du ganglioside endogène GM1. De nombreuses molécules biologiquement actives telles que le TNFα, la vitamine D3, des esters de phorbol (TPA, PMA), le fluorure d'aluminium (AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>), le sérum et les LDL oxydées ont aussi la capacité d'activer SK1 mais la plupart des mécanismes impliqués sont encore mal connus (pour revue (Maceyka *et al.*, 2002)). Le TGF-β a également été montré comme induisant une augmentation de SK1 et des taux de S1P dans des fibroblastes dermiques (Yamanaka *et al.*, 2004).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour l'augmentation de l'activité de SK1 ; il s'agirait de la modulation de son état de phosphorylation, de sa localisation, ou encore sa liaison avec des partenaires protéiques (Figure 23).



**Figure 23 - Régulation post-traductionnelle de SK1** (Chan and Pitson, 2012).

La SK1 a une activité catalytique intrinsèque (indiquée en orange) qui peut être activée par phosphorylation (indiquée en rouge) par ERK1/2 en réponse à des signaux extracellulaires puis désactivé par déphosphorylation par PP2A. L'activation médiée par la phosphorylation de SK1 entraîne sa translocation à la membrane plasmique via CIB1. L'association de SK1 avec les phosphatidylsérines (PS) et l'acide phosphatidique (PA) permet de maintenir l'enzyme au niveau de la membrane plasmique et facilite ses fonctions de signalisation. L'activation de SK1 se fait aussi via l'interaction avec eEF1A-GDP, ou via son association avec Lyn et Fyn après liaison de FcεRI dans les mastocytes. L'association de SK1 avec TRAF2 médie non seulement l'activation de SK1 induite par le TNFα, mais facilite aussi l'activité ubiquitine-ligase de TRAF2 pour induire l'activation de NF-κB. Dans certaines cellules, l'augmentation de l'activité SK1 est la conséquence de la libération d'une forme intrinsèquement active à partir d'une forme inactive liée à un inhibiteur (indiquée en jaune). Cette altération de l'activité SK1 semble contribuer à de nombreuses réponses cellulaires comme la survie et l'angiogénèse.

### **Phosphorylation par ERK1/2 et translocation à la membrane**

La stimulation de SK1 entraînerait la rapide phosphorylation de son résidu sérine 225 (S225) par ERK1/2, augmentant son activité catalytique, suivie de sa translocation du cytosol à la membrane plasmique où se situe son substrat, la sphingosine (Pitson *et al.*, 2003; Stahelin *et al.*, 2005). Cette translocation de SK1 à la membrane plasmique serait dépendante de CIB1 (Ca<sup>2+</sup>-dependent binding to calcium and integrin-binding protein 1), qui fonctionne comme une "calcium-myristoyl switch" protéine (Jarman *et al.*, 2010). L'activation de SK1 augmenterait le taux de calcium cytosolique, induisant un changement conformationnel de CIB1 qui exposerait alors son groupement myristoyl fonctionnel, lui permettant de s'associer à la bicouche lipidique et de lier SK1. Bien que CIB1 ait la capacité de se lier à la forme phosphorylée ou non phosphorylée de cette enzyme, seule SK1 phosphorylée se lie aux phosphatidylsérines membranaires via ses résidus thréonine 54 et

asparagine 89 et s'accumule donc préférentiellement à la membrane plasmique (Stahelin *et al.*, 2005). Des données récentes suggèrent que la SK1 phosphorylée se positionnerait au niveau de microdomaines appelés "rafts" lipidiques présents à la membrane plasmique et ce processus serait important pour les effets mitogéniques de SK1 en réponse à la déprivation en sérum (Hengst *et al.*, 2009). D'autre part, les interactions avec l'acide phosphatidique (Delon *et al.*, 2004) et la filamine A (Maceyka *et al.*, 2008, p 1) ont également été impliquées dans la localisation de SK1 à la membrane plasmique. Dans la plupart des cas, l'activation de SK1 est transitoire, dû à une déphosphorylation de sa S225 par la protéine phosphatase 2A (PP2A) (Barr *et al.*, 2008).

### **Régulation par la protéine kinase C**

Plusieurs études ont montré l'activation de SK1 par le PMA, activateur connu de PKC. Des sites putatifs de phosphorylation par PKC sont présents dans les SKs mais la PKC purifiée n'a aucun effet sur leur activité enzymatique *in vitro* (Buehrer *et al.*, 1996). Il s'agirait probablement d'un effet indirect passant par l'activation de la voie ERK1/2 (Griner and Kazanietz, 2007). Cette activation PKC-dépendante de SK1 serait responsable des effets cardioprotecteurs du préconditionnement ischémique chez la souris (Jin *et al.*, 2004).

### **Régulation par la phospholipase D**

L'utilisation de nucléotides antisens dirigés contre la phospholipase D (PLD) 1 a permis de démontrer que la SK1 était activée par PLD1 dans des mastocytes humains ; cette activation serait associée à une mobilisation du calcium intracellulaire et induirait la dégranulation déclenchée par FcεRI (Melendez and Khaw, 2002). Il a également été montré que la SK1 pouvait se lier à l'acide phosphatidique (PA), produit de la PLD, au niveau d'un site d'interaction présent dans sa partie C-terminale, indépendamment de son activité catalytique (Delon *et al.*, 2004). La liaison de PA à SK1 entraînerait une augmentation de l'activité SK1 *in vitro* (Olivera *et al.*, 1996). Ces données ont été vérifiées dans des études récentes montrant que, chez la plante *Arabidopsis*, le PA généré par la PLD interagissait avec SK1 et augmentait son activité catalytique (Guo and Wang, 2012). Des études précédentes ayant montré la capacité de la S1P à mobiliser les flux de calcium intracellulaire en réponse à la sécheresse (Ng *et al.*, 2001) et sachant que le calcium est un activateur clé de la PLD (Qin *et al.*, 1997), une boucle de régulation positive a ainsi été mise en évidence entre les voies SK1/(phyto-)S1P et PLD/PA dans l'amplification des messagers lipidiques en réponse au stress.

### **Régulation par les interactions protéine-protéine**

Plusieurs protéines ont été décrites comme pouvant se lier à SK1 et moduler sa fonction au sein de la cellule. Au-delà de sa translocation médiée par ERK, l'interaction avec la protéine TRAF2,

molécule adaptatrice associée au TNFR1, serait nécessaire à son activation par le TNF $\alpha$  (Xia *et al.*, 2002).

Dans les mastocytes, deux protéines de la famille des tyrosine kinases Src, nommées Lyn et Fyn, ont été montrées comme interagissant avec SK1 et augmentant son activité catalytique (Olivera *et al.*, 2006; Urtz *et al.*, 2004). Cette interaction Lyn/Fyn-SK1 serait impliquée dans l'activation de SK1 médiée par l'IgE et semble médier le recrutement de SK1 au récepteur de forte affinité pour l'IgE (Fc $\epsilon$ RI). Le mécanisme d'activation par ces protéines kinases n'est actuellement pas connu, mais Lyn et Fyn ne semblent pas phosphoryler directement SK1 (Olivera *et al.*, 2006; Urtz *et al.*, 2004).

D'autres études ont montré que la  $\delta$ -caténine et le facteur d'élongation eucaryote 1A (eEF1A) pouvaient aussi interagir avec SK1 et l'activer *in vitro* et dans des cellules, avec des conséquences fonctionnelles distinctes : l'interaction de la  $\delta$ -caténine avec SK1 a été associée à une stimulation de la motilité cellulaire, inhibable par un traitement avec l'inhibiteur de SK DMS (Fujita *et al.*, 2004), alors que l'interaction avec eEF1A a été associée à la survie et la prolifération cellulaires (Leclercq *et al.*, 2008).

### **Régulation par le calcium**

La SK1 a été impliquée à la fois comme médiateur de la mobilisation calcique intracellulaire et comme effecteur en aval du calcium dans la cellule. La SK1 possède deux sites putatifs de liaison au complexe calcium/calmoduline mais celui-ci n'a pas d'effet sur son activité enzymatique et jouerait plutôt un rôle dans sa translocation à la membrane plasmique (Young *et al.*, 2003). Plusieurs études ont montré que le calcium induisait une activation de SK1 suite à une dépolarisation de la membrane (Alemany *et al.*, 2001) ou en réponse à une stimulation de récepteurs purinergiques et muscariniques (Alemany *et al.*, 2000; van Koppen *et al.*, 2001). L'utilisation d'un chélateur de calcium inhiberait l'activation de SK1 par le calcium.

### **b) Activation transcriptionnelle**

Suite à une activation post-traductionnelle rapide et transitoire de SK1 en réponse aux facteurs décrits ci-dessus, le gène *SPHK1* peut être activé transcriptionnellement par plusieurs facteurs. Une étude a montré que le fragment de 55 pb localisé devant l'exon 1d médiait la transcription du gène *Sphk1* induite par le NGF (nerve growth factor) chez le rat (Sobue *et al.*, 2005). Ce fragment contient un site de liaison AP-2 (activator protein-2) et deux sites Sp1 (specificity protein 1). De façon intéressante, seul le site Sp1 proximal serait requis pour l'expression intrinsèque de *Sphk1* chez le rat. Cependant, l'analyse de la région 5' du gène *SPHK1* humain a révélé qu'un fragment de 300 pb contenait un motif de liaison Sp1 et deux motifs de liaison AP-2, impliqués dans

la transcription de *SPHK1* en réponse au PMA dans des cellules leucémiques humaines MEG-01 (Nakade *et al.*, 2003). Cette induction passerait par l'activation des voies de signalisation de PKC et ERK.

Ces voies seraient également impliquées dans l'induction de l'expression de *SPHK1* dans des cellules endothéliales en réponse à l'histamine, nécessitant les motifs de liaison Sp1 et AP-2 (Huwiler *et al.*, 2006). L'importance de ces sites de liaison est également soulignée par l'augmentation de l'activité promotrice de *SPHK1* induite par la prolactine et le GDNF (glial cell-derived neurotrophic factor) utilisant ces domaines Sp1 et AP-2 dans des cellules MCF7 (Döll *et al.*, 2007) et des cellules de neuroblastome TGW (Murakami *et al.*, 2007). De plus, l'induction de *SPHK1* par la prolactine nécessite l'activation de STAT5, alors que le GDNF induit la transcription via les voies PI3K et ERK1/2.

Des travaux ont montré que l'expression de *SPHK1* était induite dans des cellules de gliome soumises à un stress hypoxique (Anelli *et al.*, 2008). Cette augmentation d'expression s'accompagne d'une augmentation de production intracellulaire et de sécrétion de S1P. L'hypoxie est connue pour stabiliser les facteurs de transcription HIFs (hypoxia-inducible factors) qui se lient à des éléments de réponse HRE (hypoxia response element) afin de réguler l'expression de gènes inductibles par l'hypoxie. La région 5' du gène *SPHK1* contient deux séquences HRE, reconnues par les facteurs HIF1 $\alpha$  et HIF2 $\alpha$ . De façon réciproque, SK1 favoriserait la stabilisation et une accumulation de HIF1 $\alpha$  via la signalisation Akt/GSK3 $\beta$  (pour revue (Ader *et al.*, 2009)).

#### **2.1.1.3.2. SK1 : inhibition**

La majorité des études s'intéressant aux fonctions de SK1 se sont focalisées sur ses mécanismes d'activation et peu de choses sont connues concernant son inhibition. Cependant, il a été rapporté que la SK1 pouvait être dégradée suite à la stimulation des cellules avec des agents induisant une mort cellulaire programmée, tels que le TNF $\alpha$  ou des dommages à l'ADN. Sa protéolyse pourrait mettre en jeu la cathepsine B compte tenu du fait que cette protéase est capable de cliver SK1 *in vitro* et que son inhibition empêche la perte de SK1 en réponse au TNF $\alpha$ . D'autre part, l'activité de SK1 peut être réduite suite à son interaction avec des protéines comme SKIP (SK1-interacting protein) (Lacaná *et al.*, 2002), PECAM-1 (Fukuda *et al.*, 2004) et aminoacylase-1 (Maceyka *et al.*, 2004). De même, la protéine RPK118 se lierait à SK1 par un domaine pseudokinase et régulerait sa localisation en la recrutant aux endosomes précoces (Hayashi *et al.*, 2002). De plus, une étude récente a montré que la protéine SK1 pouvait être protéolysée en réponse à un stress génotoxique de façon p53-dépendante et a révélé que l'action anti-tumorale de p53 était médiée par une augmentation des taux de sphingosine et de céramide liée à la perte de SK1, suivie d'une

augmentation d'expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire et de la sénescence des cellules tumorales (Heffernan-Stroud *et al.*, 2012).

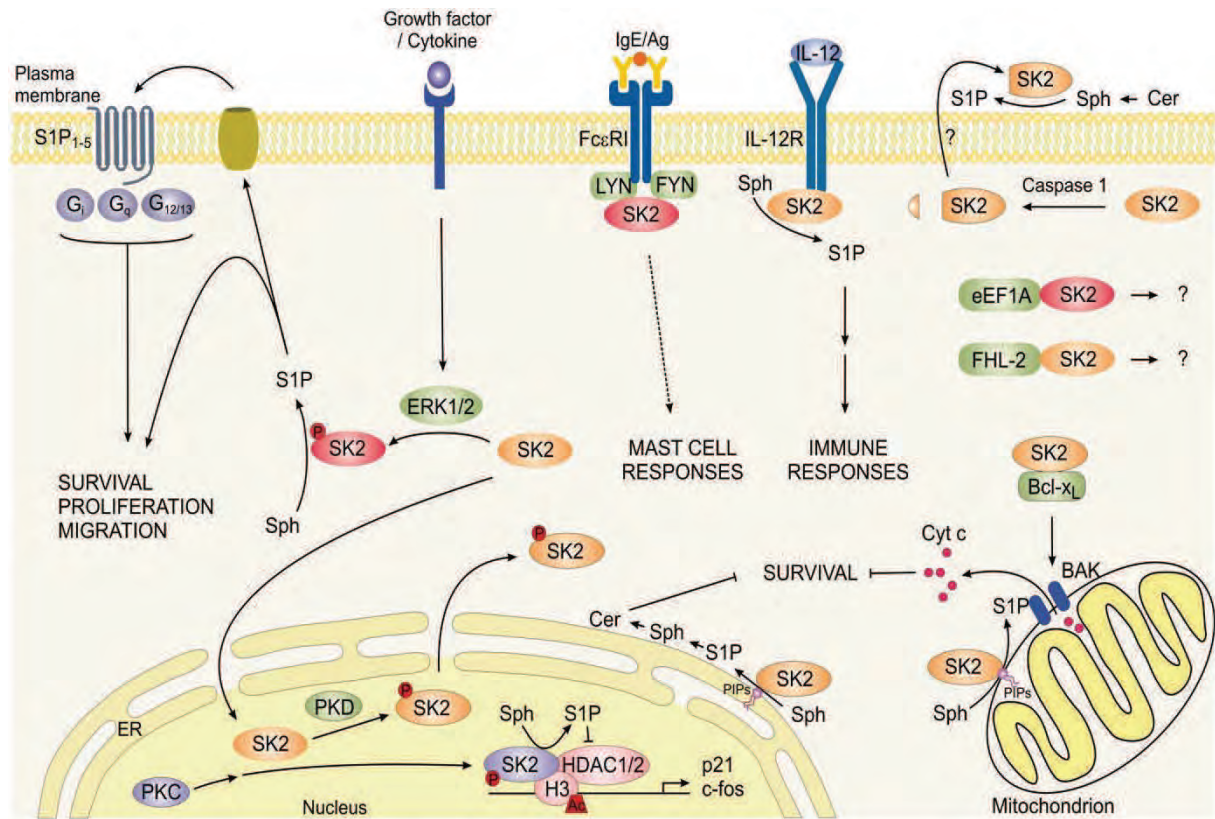
### 2.1.1.3.3. Régulation de la SK2

Les mécanismes de régulation de SK2, tout comme ses fonctions, sont bien moins connus et ont été beaucoup moins étudiés que ceux de SK1. Il a été montré que la surexpression de SK2 induisait l'apoptose dans plusieurs lignées cellulaires, et cette apoptose faisait suite à la libération de cytochrome c et à l'activation de la caspase-3 mais n'était pas médiée par les récepteurs à la S1P (Liu *et al.*, 2003). La protéine SK2 contient un motif similaire à celui présent dans les protéines dites "BH3-only" qui représentent un sous-groupe pro-apoptotique de la famille de Bcl-2. La mutation de cette région réduit considérablement l'apoptose induite par SK2 (Liu *et al.*, 2003). Des études ont montré que l'activité de SK2, comme celle de SK1, augmentait en réponse à des agonistes comme l'EGF ainsi qu'aux esters de phorbol (Hait *et al.*, 2007, 2005) (Figures 22 et 24). Il a été rapporté que l'activation de SK2 pouvait être médiée par sa phosphorylation par ERK1/2 sur les résidus Ser351 et/ou Thr578 (Hait *et al.*, 2007). De plus, cette enzyme possède elle aussi des sites putatifs de phosphorylation par PKC. Un site de liaison conservé entre SK1 et SK2 permettrait à SK2 de se lier à la calmoduline mais, contrairement à SK1, cette interaction n'altérerait pas sa localisation cellulaire (Sutherland *et al.*, 2006). Dans les mastocytes, le récepteur à l'immunoglobuline E, FcεRI, connu pour activer SK1, activerait également SK2. Cette activation passerait par l'interaction avec la Src tyrosine kinase Fyn (Olivera *et al.*, 2006).

Malgré le rôle proapoptotique de SK2 révélé dans la plupart des études effectuées sur cette enzyme, d'autres études montrent que SK2 pourrait également exercer des effets protecteurs. En effet, une étude montrée que la SK2 était activée par l'hypoxie et engendrait des effets protecteurs des cellules A549 vis-à-vis de l'apoptose induite par l'étoposide (Schnitzer *et al.*, 2009). De plus, l'inhibition de SK2 a été rapportée comme augmentant l'apoptose de cellules MCF7, HCT116 et des cellules de glioblastome et inhibant l'expression de p21, inhibiteur de kinase dépendante de cycline, basale ou induite par la doxorubicine (Sankala *et al.*, 2007). Il a été suggéré que ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par un défaut de localisation de SK2 lors de sa surexpression, entraînant la libération de son domaine "BH3-only" dans le cytoplasme et l'induction de l'apoptose (Sankala *et al.*, 2007). L'exposition des phosphatidylsérines, normalement localisées dans le feuillet interne de la membrane plasmique, sur le feuillet externe des cellules en apoptose ainsi que le clivage de SK2 par la caspase-1 entraîne le relargage d'un fragment tronqué mais actif de SK2 produisant localement de la S1P (Weigert *et al.*, 2010). SK2 a également été impliquée dans la

production et la libération de S1P par les cellules apoptotiques, la S1P sécrétée pouvant servir de messager de survie prévenant la destruction des cellules avoisinantes (Weigert *et al.*, 2006).

Les mécanismes de régulation de cette enzyme sont cependant encore aujourd'hui très peu connus.



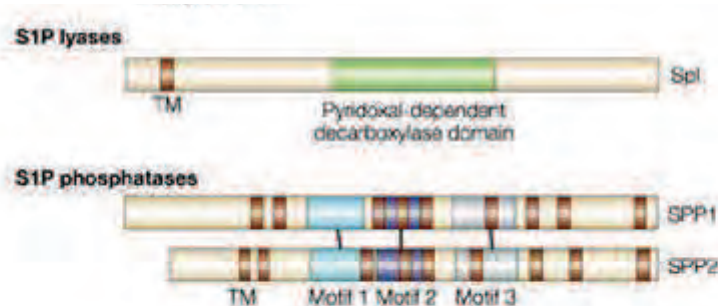
**Figure 24 - Régulation post-traductionnelle de SK2** (Chan and Pitson, 2012).

L'activation de SK2 peut se faire via la phosphorylation médiée par ERK1/2 en réponse à une large variété de facteurs de croissance et de cytokines. Des protéines peuvent interagir avec SK2, résultant en une augmentation de son activité. De plus, l'interaction de SK2 avec les phosphatidylinositol phosphates (PIPs) entraîne aussi la relocalisation de cette enzyme au niveau de différents compartiments subcellulaires. La localisation nucléaire de SK2 est régulée par des signaux de localisation et d'export nucléaire. Dans le noyau, SK2 peut s'associer avec les complexes histone H3–HDAC1/2 pour faciliter la génération de S1P qui inhibe ensuite la déacétylation de l'histone H3 médiée par HDAC1/2 promouvant ainsi la transcription de l'inhibiteur de kinase dépendante de cycline p21 et du régulateur transcriptionnel c-fos. SK2 semble contribuer à l'apoptose via de multiples mécanismes, incluant la séquestration du facteur de survie Bcl-x<sub>L</sub>, la génération mitochondriale de S1P qui modulerait la libération de cytochrome c médiée par Bak et la génération de S1P localisée au niveau du RE facilitant la génération de céramide par la voie de recyclage sphingolipidique. SK2 peut aussi être libérée de la cellule suite à un clivage par la caspase-1 pour permettre la génération de S1P extracellulaire.



## 2.1.2. Dégradation de la S1P : S1P phosphatases et S1P lyase

La S1P peut être catabolisée selon deux voies : une voie réversible de déphosphorylation par des phosphatases et une voie irréversible de dégradation par la S1P lyase.



**Figure 25 - Structure schématique des S1P lyases et S1P phosphatases** (Spiegel and Milstien, 2003). La SPL a un domaine transmembranaire du côté N-terminal et un domaine conservé décarboxylase dépendante du pyridoxal qui contient plusieurs résidus cystéines essentiels. Les SPPs contiennent 8-10 domaines transmembranaires prédits et ont trois motifs conservés.

### 2.1.2.1. Les S1P phosphatases

La S1P peut être déphosphorylée à la surface cellulaire par une famille de phosphatases à spécificité large, les lipide-phosphate phosphatases (LPP1-3), mais aussi de façon spécifique par les S1P phosphatases (SPP1 et SPP2) au niveau du RE.

#### 2.1.2.1.1. Les lipide-phosphate phosphatases

Trois isoformes de LPPs (LPP1-3) et un variant d'épissage (LPP1a) ont été clonés. Ces enzymes ont une large spécificité de substrat *in vitro* et catalysent la déphosphorylation de plusieurs lipides phosphates tels que le PA, la S1P, le LPA et le C1P. Elles sont caractérisées par leur indépendance vis-à-vis du  $Mg^{2+}$  et leur insensibilité au N-éthylmaléimide (Brindley *et al.*, 2002). Les LPPs possèdent six domaines transmembranaires et leur domaine catalytique est situé du côté extracellulaire. Il serait composé de trois domaines distincts, le domaine C1 contenant le site de reconnaissance du substrat et les domaines C2 et C3 formeraient le site catalytique. Le seul mode de régulation connu de ces protéines est la modulation de leur expression (pour revue (Pyne *et al.*, 2009)).

#### 2.1.2.1.2. Les S1P phosphatases

##### 2.1.2.1.2.1. Caractéristiques structurales et fonctionnelles

Les S1P phosphatases ont tout d'abord été identifiées chez la levure comme étant des régulateurs importants de la réponse au stress induit par la chaleur. Sur la base de leur homologie

avec les gènes de la levure, deux gènes codant pour des SPPs mammifères, SPP1 et SPP2, ne dégradant que des bases sphingoïdes phosphorylées, ont été clonés (Figure 25). Ils sont situés sur les chromosomes 14q23.1 et 2q36.3, respectivement. Ces SPPs appartiennent à la famille des lipide-phosphate phosphohydrolases de type 2 dépendantes du magnésium et insensibles au N-éthylmaléimide et contiennent 8 domaines transmembranaires putatifs. Cependant, à l'exception des résidus conservés dans les trois domaines présents dans toutes des LPPs, les SPPs ne présentent qu'une faible homologie avec les autres LPPs connues (pour revue (Spiegel and Milstien, 2003)).

#### **2.1.2.1.2.2. Localisation**

Alors que les LPPs sont localisées à la membrane plasmique et agissent en ectophosphatases, les SPPs, comme leurs homologues chez la levure, sont localisées au niveau du RE. Les SPPs sont exprimées de façon ubiquitaire, avec une forte expression au niveau du rein. De plus, SPP1 est fortement exprimée dans le placenta alors que l'expression de SPP2 est élevée dans le cœur, et est augmentée au cours de la réponse inflammatoire (pour revue (Gault *et al.*, 2010)).

#### **2.1.2.1.2.3. Régulation**

Les mécanismes moléculaires de la régulation des SPPs sont peu connus. Pourtant, la modulation des taux de SPPs modifie le devenir métabolique de la S1P, ainsi que les effets biologiques médiés par ce lipide. En effet, la surexpression de SPP1 se traduit par une augmentation de l'accumulation de céramide au niveau du RE, effet exacerbé par l'ajout de S1P extracellulaire. Cette accumulation induit une augmentation de la mort cellulaire par apoptose (Le Stunff *et al.*, 2002). A l'inverse, une étude récente a rapporté que la déplétion en SPP1, en régulant l'homéostasie intracellulaire de la S1P, contrôlait l'autophagie induite par une réponse UPR (unfolded protein response) et un stress du RE et que ce processus était associé à la survie cellulaire médiée par Akt (Lépine *et al.*, 2011 b). En revanche, après traitement des cellules déplétées en SPP1 à la doxorubicine, cette autophagie protectrice est changée en apoptose par clivage de Atg5 (autophagy-related gene 5) par la calpaïne (Lépine *et al.*, 2011 a). Par ailleurs, la surexpression de SPP1 se traduit par une diminution de sécrétion de S1P dans le milieu extracellulaire, suggérant que SPP1 puisse réguler négativement la signalisation extracellulaire de ce phospholipide (Johnson *et al.*, 2003). D'autre part, SPP1 accéderait à la S1P extracellulaire grâce à son import intracellulaire dépendant du transporteur CFTR (Peter *et al.*, 2008). A l'inverse, l'inhibition de l'expression de SPP1 se traduit par une résistance à la mort induite par des agents cytotoxiques comme le TNF $\alpha$  ou la daunorubicine (Johnson *et al.*, 2003). Plus récemment, il a été montré que la surexpression de SK2 entraînait une augmentation de la formation de céramide par SPP1, suggérant une coordination de SPP1 et SK2 dans la voie de recyclage de sphingosine (Le Stunff *et al.*, 2007).

Par ailleurs, il a été montré que SPP1, en régulant les taux de céramide au niveau du RE, influençait le transport membranaire antérograde du céramide et des protéines du RE à l'appareil de Golgi (Giussani *et al.*, 2006). Plusieurs études ont rapporté des altérations de l'expression des SPPs dans diverses conditions pathologiques, impliquant des phosphatases dans la régulation du tonus vasculaire, dans la pathophysiologie de maladies inflammatoires ou encore dans le cancer (pour revue (Fyrst and Saba, 2010)).

A ce jour, les fonctions et la régulation de l'isoforme SPP2 sont très peu connues. Elle serait cependant activée dans des cellules endothéliales suite à une stimulation par des agents tels que le TNF $\alpha$  et le LPS, et serait impliquée dans la production d'IL-1 $\beta$ , suggérant un rôle de cette enzyme dans les réponses inflammatoires (Mechtcheriakova *et al.*, 2007).

### **2.1.2.2. La S1P lyase**

#### **2.1.2.2.1. Caractéristiques structurales et fonctionnelles**

La S1P lyase (SPL) est l'enzyme finale de la voie de dégradation des sphingolipides et représente la sortie de leur métabolisme. La SPL est un régulateur important de la S1P et influence différents aspects cellulaires tels que la croissance, la prolifération et la mort (Bartke and Hannun, 2009; Saddoughi *et al.*, 2008). Elle catalyse la dégradation de la S1P par clivage de la liaison C2-C3 et libère un aldéhyde à longue chaîne et une éthanolamine phosphate. La dihydroS1P, la phytoS1P et la dihydrosphingosine 1-phosphonate sont également substrats de la SPL. La SPL appartient à la superfamille des enzymes dépendantes du pyridoxal 5'-phosphate (PLP). L'activité SPL a été décrite en 1969 (Stoffel *et al.*, 1969), et le gène *BST1/DPL1*, premier gène de la SPL identifié chez la levure, a été cloné en 1997 (Saba *et al.*, 1997). Des recherches par homologie ont ensuite permis de cloner et caractériser la SPL dans d'autres organismes comme *C. elegans* (Mendel *et al.*, 2003), *Mus musculus* (Zhou and Saba, 1998), *Dictyostelium discoideum* (Li *et al.*, 2001 a), *L. major* (Zhang *et al.*, 2007), *D. melanogaster* (Herr *et al.*, 2003, p 200) and *Arabidopsis thaliana* (Tsegaye *et al.*, 2007). Van Veldhoven et ses collaborateurs furent les premiers à identifier le gène de la SPL humaine, localisé sur le chromosome 10q21, qui code pour une protéine de 63,5 kDa (Van Veldhoven *et al.*, 2000). D'un point de vue structural, la SPL possède un seul domaine transmembranaire proche de son extrémité N-terminale et son domaine catalytique se situe du côté cytosolique du RE (pour revue (Serra and Saba, 2010)) (Figure 25).

En 2005, une étude publiée par le groupe de Jason Cryster a montré que l'inhibition pharmacologique de la SPL chez des souris induisait une lymphopénie, révélant l'intérêt potentiel de cibler cette enzyme afin d'induire une immunodépression dans les maladies autoimmunes (Schwab

*et al.*, 2005). Depuis, de nombreux travaux se sont intéressés à la biologie de cette enzyme et à sa modulation par des agents pharmacologiques en recherche clinique (Bagdanoff *et al.*, 2010).

D'autre part, l'importance de cette enzyme a également été révélée par la génération de souris déficientes pour le gène de la SPL (*Sgpl1*<sup>-/-</sup>). Ces animaux ne survivent pas au-delà de 3-4 semaines après la naissance et présentent des anomalies de croissance et une anémie. Plusieurs défauts congénitaux ont été décrits incluant des anomalies vasculaires, squelettiques, des malformations thoraciques du sternum, des côtes et des vertèbres ainsi que des anomalies rénales (Schmahl *et al.*, 2007). Ces observations suggèrent que la SPL est essentielle dans le développement de nombreux tissus chez les mammifères (pour revue (Aguilar and Saba, 2011)).

#### **2.1.2.2.2. Localisation**

D'un point de vue subcellulaire, la SPL est exclusivement localisée au niveau du RE et son site catalytique cytosolique lui permet d'accéder directement à la S1P générée dans ce compartiment.

Chez les mammifères, la SPL est exprimée dans de nombreux tissus. Une étude récente a évalué son expression dans les tissus embryonnaires et adultes de souris, rapportant qu'elle était exprimée dans les cellules stromales thymiques et spléniques, les splénocytes, les plaques de Peyer, les agrégats lymphoïdes du côlon, les granulocytes, les monocytes et les lymphocytes T et B circulants, le taux d'expression le plus faible étant retrouvé dans les thymocytes. Son niveau d'expression est élevé dans le système nerveux central, incluant les cellules du lignage arachnoïde, la moelle épinière, le plexus choroïde, le ganglion du nerf trijumeau et des neurones spécifiques du bulbe olfactif, le cortex cérébral, le mésencéphale, le rhombencéphale et le cervelet. Son expression a aussi été détectée dans le tissu adipeux brun, les gonades femelles, la corticosurrénale, l'épithélium de la vessie, les glandes harderiennes et préputiales, et les follicules pileux (Borowsky *et al.*, 2012). Ces données sont en désaccord avec une étude précédente ayant montré que le niveau d'expression de la SPL le plus élevé était retrouvé au niveau du thymus et des intestins, et le plus faible au niveau du cerveau et du muscle squelettique (Ikeda *et al.*, 2004). Il a également été montré que l'expression de cette enzyme était forte dans l'épithélium thymique et très faible dans les lymphocytes, établissant un gradient de S1P entre les différents compartiments et essentiel pour le trafic lymphocytaire du thymus vers la circulation sanguine et les organes lymphoïdes secondaires (Schwab *et al.*, 2005). En revanche, aucune activité SPL n'est détectée dans les plaquettes et les cellules érythrocytaires, puisqu'elles sont dépourvues de RE (Ito *et al.*, 2007; Yatomi *et al.*, 1997).

#### **2.1.2.2.3. Régulation**

L'activité de la SPL est régulée au niveau épigénétique, transcriptionnel et post-traductionnel.

### **a) Régulation transcriptionnelle**

Un mécanisme conservé de régulation transcriptionnelle de l'expression de la SPL par les facteurs de transcription GATA a été identifié chez le nématode et l'humain (Oskouian *et al.*, 2005). La SPL a également été identifiée comme une cible transcriptionnelle directe de la signalisation du PDGF (Chen *et al.*, 2004). Des approches de génomique comparative ont aussi rapporté la présence de motifs de reconnaissance par des facteurs de type "early growth response factor", "zinc-binding protein factor" et "GC-box factor" dans la région 5' non traduite du gène de la SPL (Chen *et al.*, 2004; Hutton *et al.*, 2004). Une étude récente a mis en évidence l'implication du facteur de transcription Sp1 se liant seul ou complexé au facteur GATA-4 (Sp1/GATA-4) aux sites Sp1, de type "GC-box", du promoteur de la SPL dans des cellules de cancer pulmonaire humain (Ito *et al.*, 2011). Par ailleurs, une étude a rapporté que le gène *Sgpl1*, ainsi que d'autres gènes pro-apoptotiques, était une cible de mSin3A, facteur membre d'un complexe co-répresseur impliqué dans le développement embryonnaire et dans la régulation de fonctions cellulaires telles que la progression du cycle cellulaire, la prolifération, la réparation de l'ADN, l'apoptose et le métabolisme mitochondrial (Dannenbergh *et al.*, 2005). Cependant, le rôle de ces facteurs dans la régulation des fonctions biologiques médiées par la SPL n'est pas clairement établi.

### **b) Régulation post-traductionnelle**

Au niveau post-traductionnel, la SPL a été identifiée lors d'un criblage de protéines nitrosylées suggérant que cette enzyme était régulée par nitrosylation de ses résidus tyrosine Y356 et Y366 (Zhan and Desiderio, 2006). L'altération de la charge de ces résidus, situés au niveau du site actif de l'enzyme, pourrait interférer avec la liaison au substrat. Plusieurs sites spécifiques de phosphorylation ont également été prédits par l'analyse de la séquence protéique de la SPL mais n'ont pas été validés expérimentalement (Huang *et al.*, 2005). Dans une étude récente, la protéine Dpl1p, homologue de la SPL chez la levure, a été montrée comme formant des complexes par oligomérisation, nécessaires à sa fonction *in vivo* (Mukhopadhyay *et al.*, 2008). Bien que cette hypothèse n'ait pas été vérifiée pour la SPL humaine, la notion d'une régulation fonctionnelle par l'assemblage de sous-unités et la formation de multimères reste intéressante.

D'un point de vue fonctionnel, il a été montré que sa surexpression dans des cellules HEK293 et des cellules A549 de cancer pulmonaire humain augmentait la sensibilité des cellules à des agents cytotoxiques tels que le cisplatine, le carboplatine et la doxorubicine mais pas à la vincristine ni au chlorambucile (pour revue (Alexander and Alexander, 2011)). Une étude a aussi montré que l'expression de la SPL dans les cellules HEK293 entraînait une diminution des taux de sphingosine et de S1P parallèlement à une augmentation des taux de céramide en réponse au stress (absence de

sérum), induisant l'apoptose (Reiss *et al.*, 2004). La sensibilisation des cellules au cisplatine par l'expression ectopique de SPL serait médiée par les voies de p53 et p38, et serait dépendante de la phosphorylation et l'activation de p38 (Min *et al.*, 2005; Oskouian *et al.*, 2006). De plus, il a été rapporté que la SPL était sous-exprimée dans le cancer du côlon en comparaison avec des tissus sains adjacents aux tumeurs, suggérant une régulation génétique ou épigénétique de cette enzyme potentiellement impliquée dans la carcinogenèse (Oskouian *et al.*, 2006). Notre équipe a également montré une sous-expression de cette enzyme dans des lignées de mélanome en comparaison avec des mélanocytes sains (Colié *et al.*, 2009). De plus, la déficience en SPL conférerait une résistance à la chimiothérapie et favoriserait la tumorigenèse via une surexpression de Bcl-2/Bcl-xL (Colié *et al.*, 2009). Il a aussi été rapporté que la déficience en SPL modifierait l'expression de nombreux gènes et augmenterait notamment l'expression de PPAR $\gamma$ , régulateur transcriptionnel important du métabolisme lipidique, et serait associée à une élévation des taux de diacylglycérol, triacylglycérol, phospholipides et cholestérol total et estérifié dans le foie et le plasma (Bektas *et al.*, 2010). D'autre part, l'expression de la SPL apparaît diminuée en réponse au shear stress laminaire parallèlement à une augmentation de la sécrétion de S1P par des cellules endothéliales *in vitro* (Venkataraman *et al.*, 2008). A l'inverse, une surexpression ainsi qu'une activation de cette enzyme a été mise en évidence en réponse à l'ischémie et suite à des radiations ou lésions chimiques (Fyrst and Saba, 2010).

Par ailleurs, au-delà de la régulation des pools de S1P et des intermédiaires sphingolipidiques, la SPL pourrait exercer ses effets à travers les produits de dégradation de la S1P, une éthanolamine phosphate et un hexadécénal.

### **c) Effets biologiques des produits de dégradation**

L'hexadécénal est métabolisé en palmitate et palmitoyl-CoA, qui sont ensuite utilisés comme précurseurs de sphingolipides et glycosphingolipides ; la phosphoéthanolamine est utilisée pour la synthèse de phosphatidyléthanolamine via la CDP-éthanolamine (van Veldhoven and Mannaerts, 1993). La phosphoéthanolamine et l'éthanolamine générée par sa déphosphorylation ont toutes deux été rapportées comme ayant des effets mitogènes dans des cellules de cancer mammaire de rat et des fibroblastes murins, respectivement (Kano-Sueoka *et al.*, 1979; Kariya *et al.*, 2005; Kiss *et al.*, 1997). Il a aussi été montré que l'éthanolamine phosphate était nécessaire à la croissance végétative de *Leishmania major* et à son pouvoir pathogène chez l'homme (Zhang *et al.*, 2007). D'autre part, une étude récente a rapporté que le traitement de cellules humaines et murines par de l'hexadécénal induisait une réorganisation du cytosquelette, le détachement cellulaire ainsi que l'apoptose de façon dépendante de la voie de signalisation JNK (Kumar *et al.*, 2011). Le même groupe a ensuite mis en évidence la capacité de ce métabolite à interagir avec les désoxyguanosines et à

former des adduits d'ADN dérivés d'aldéhyde aux conséquences potentiellement mutagènes (Upadhyaya *et al.*, 2012). De plus, une étude publiée très récemment par le groupe de D.R. Green a montré que la S1P et l'hexadécénal favorisaient la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et l'induction de l'apoptose induite par le TNF $\alpha$  en interagissant avec les membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2, Bax et Bak (Chipuk *et al.*, 2012).

## **2.2. Localisation et transport de la S1P**

### **2.2.1. Sources de S1P et gradient de concentration**

Différents travaux ont montré que la S1P était abondante dans le plasma où elle est principalement liée à l'albumine et aux lipoprotéines de haute densité (HDL), avec une concentration allant de 0,1 à 1,2  $\mu$ M. Cette concentration est 4 à 5 fois plus faible dans la lymphe et environ 1000 fois inférieure dans les fluides interstitiels (Pappu *et al.*, 2007). Ce large contraste entre les compartiments vasculaires et extravasculaires génère un gradient de concentration de S1P et joue un rôle essentiel dans la circulation et la maturation des lymphocytes. Les plaquettes ont longtemps été considérées comme étant la source majeure de S1P dans le plasma car elles présentent une forte activité SK et sont dépourvues de SPL. Cependant, des études ont montré que la déplétion en plaquettes par des moyens génétiques ou pharmacologiques chez la souris n'avait qu'un faible effet sur les taux de S1P plasmatique. De plus, une approche utilisant un modèle d'inactivation conditionnelle pour SK1 et SK2 a mis en évidence que la S1P provenait principalement des érythrocytes (Ito *et al.*, 2007; Pappu *et al.*, 2007; Venkataraman *et al.*, 2008). Ces cellules ont une activité SK plus faible que les plaquettes mais sont dépourvues de SPPs et SPL. Il a été proposé que ces cellules puissent incorporer la S1P à partir de tissus sources et la stocker afin de la protéger de toute dégradation cellulaire, servant ainsi de réserve plasmatique (Hänel *et al.*, 2007). Compte-tenu de la courte demi-vie de ce lipide ( $\sim$ 15 minutes), les fortes concentrations de S1P dans le plasma impliquent la présence d'une source de biosynthèse de grande capacité dans de multiples types cellulaires, à la fois hématopoïétiques (comme les érythrocytes) et non-hématopoïétiques (comme les cellules endothéliales) (Venkataraman *et al.*, 2008). Cependant, la contribution de chacun et les mécanismes permettant le maintien de ce gradient restent encore à élucider.

### **2.2.2. Transport de la S1P**

La S1P étant principalement générée en intracellulaire, l'existence de mécanismes d'export est suggérée par les concentrations élevées de ce lysophospholipide dans les compartiments extracellulaires. Compte tenu de sa polarité qui ne lui permet pas de traverser les membranes et des écarts entre les taux intra- et extra-cellulaires, il est raisonnable de penser que son transport est actif

et nécessite de l'énergie. Plusieurs études ont montré l'implication de transporteurs de la famille ABC, protéines transmembranaires hydrolysant de l'ATP pour transloquer divers substrats à travers les membranes. Notamment, les transporteurs ABCA1, ABCG1 et SR-B1 participeraient au transport de la S1P associée aux HDL. Le transporteur ABCA1 dans les astrocytes permettrait l'accumulation extracellulaire de S1P couplée à la formation de lipoprotéines de type HDL (Sato *et al.*, 2007). Aussi, l'apolipoprotéine M, impliquée dans l'efflux de cholestérol, est capable de fixer la S1P dans les HDL et possède un site de liaison à ce lysophospholipide (Christoffersen *et al.*, 2011). Les transporteurs ABCC1 et ABCA7 seraient impliqués dans l'export de S1P des mastocytes et des plaquettes, respectivement. Des travaux ont également montré que la protéine SPNS2, avec douze domaines transmembranaires putatifs et identifiée chez le poisson-zèbre comme transporteur de la S1P impliqué dans la migration de progéniteurs cardiaques (Kawahara *et al.*, 2009), était impliquée dans l'efflux d'analogues de la S1P comme le FTY720-P (Hisano *et al.*, 2011).

D'autre part, une étude proposerait l'implication du CFTR dans l'import de la S1P dans la cellule (Boujaoude *et al.*, 2001). Plus récemment, il a été suggéré que le transporteur ABCB1 (aussi appelée glycoprotéine-p ou MDR1) contribuerait à l'absorption sélective de sphingosine issue des sphingolipides alimentaires dans le tractus digestif (Sugawara *et al.*, 2004) et pourrait éventuellement transporter la S1P (pour revue (Liu *et al.*, 2012)).

La concentration plasmatique de S1P pourrait également dépendre de la présence de SKs dans le milieu extracellulaire. En effet, des études ont montré que la SK1 pouvait être relarguée par différents types cellulaires indépendamment de stimuli par une voie de sécrétion non classique (Venkataraman *et al.*, 2006). Elle générerait alors de la S1P à partir de la dégradation de sphingomyéline au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique directement en extracellulaire, la protégeant ainsi de sa dégradation par les SPPs et SPL intracellulaires, et contribuerait au gradient de S1P (Pitson, 2011).

### **2.3. Modes d'action de la S1P**

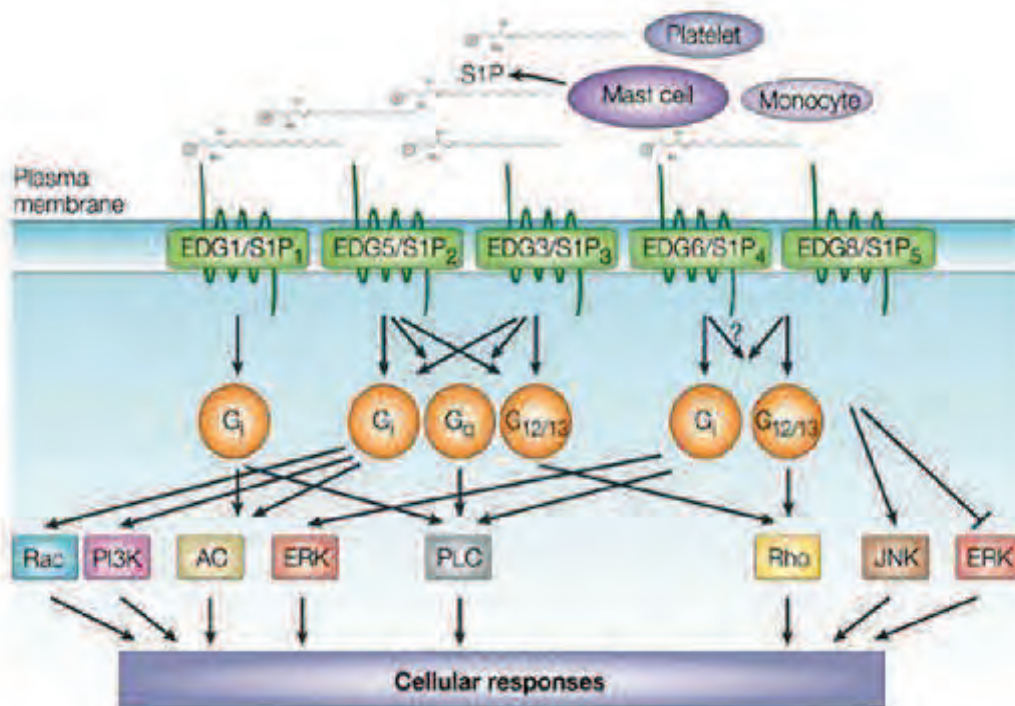
La S1P est impliquée dans de nombreux processus biologiques et médie ses effets selon deux modes d'action : le plus documenté concerne son action extracellulaire via l'interaction avec ses récepteurs présents à la surface cellulaire, les S1PRs, mais elle peut également agir directement en intracellulaire en tant que second messenger.

#### **2.3.1. Action extracellulaire : les S1PRs**

Une fois sécrétée, la S1P peut agir de façon autocrine et/ou paracrine en se fixant à ses récepteurs, les S1PRs, qui sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à des



protéines G. Cinq S1PRs (S1PR1 à S1PR5) sont connus à ce jour et leur expression est variable selon les tissus et les types cellulaires (Chun *et al.*, 2010). Ils appartiennent à la famille des récepteurs EDG (Endothelial Differentiation Gene) et chacun est couplé à des protéines G spécifiques, pouvant médier des effets biologiques variables après activation (pour revue (Strub *et al.*, 2010)) (Figure 26). Ainsi, suite à l'activation de la SK par des agonistes, la S1P produite/sécrétée va activer un ou plusieurs de ses récepteurs, créant une boucle de signalisation qualifiée de "inside-out" (Spiegel and Milstien, 2000; Takabe *et al.*, 2008).



**Figure 26 - La S1P est ligand de cinq récepteurs couplés aux protéines G** (Spiegel and Milstien, 2003).

La S1P se lie à des membres spécifiques de la famille des récepteurs à la S1P qui sont couplés à différentes protéines G entraînant l'activation ou l'inhibition des voies de signalisation indiquées. Seulement quelques exemples de ces voies sont illustrés — en particulier, ERK, extracellular signal-regulated kinase; JNK, Jun amino terminal kinase; les petites GTPases de la famille Rho (Rho et Rac); PLC, phospholipase C; AC, adenylyl cyclase–cyclic AMP; et PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase.

### **S1PR1**

Ce récepteur, initialement nommé EDG1, est exprimé de façon ubiquitaire et présente des taux élevés dans le cerveau, les poumons, la rate, le système cardiovasculaire et les reins. Il fixe la S1P avec haute affinité ( $K_d=8,1nM$ ) et est couplé à la protéine G<sub>i</sub> (Lee *et al.*, 1998) ; sa structure cristallographique vient d'être publiée par le groupe de S. Spiegel (Parrill *et al.*, 2012). A l'origine, il a été impliqué dans la différenciation des cellules endothéliales (Hla and Maciag, 1990) mais depuis sa découverte de nombreux effets induits par la S1P lui ont été attribués. Ceux-ci incluent la régulation

de la migration cellulaire, de la prolifération, de la survie et de la morphogénèse (Lee *et al.*, 1999, 1998; Paik *et al.*, 2001). La déficience en S1PR1 chez la souris entraîne une létalité embryonnaire à E12,5 suite à des défauts de maturation vasculaire entraînant des hémorragies (Liu *et al.*, 2000 b). Ce récepteur joue un rôle important dans l'angiogénèse et dans le maintien de l'intégrité vasculaire en activant des molécules effectrices comme Akt et Rac de façon G<sub>i</sub>- et PI3K-dépendante (Kono *et al.*, 2004; Singleton *et al.*, 2006). Il a été montré que son activation conduisait à la formation de lamellipodes et de jonctions cellulaires adhérentes (Lee *et al.*, 2001, 1999). Bien que le S1PR1 soit généralement associé à la voie de Rac, une étude a montré qu'il est capable d'activer les intégrines contenant  $\beta_1$  et  $\alpha_v\beta_3$  sur les cellules endothéliales via la petite GTPase Rho, ces données restent cependant à confirmer (Paik *et al.*, 2001).

S1PR1 est également impliqué dans la fonction des cellules immunes et son expression est requise pour la sortie des lymphocytes des ganglions lymphatiques (Matloubian *et al.*, 2004). La transplantation de thymocytes et lymphocytes déficients en S1PR1 à des souris normales résulte en leur séquestration dans les ganglions lymphatiques et les plaques de Peyer. A l'inverse, la surexpression de S1PR1 dans des cellules T se traduit par une distribution préférentiellement dans le sang (Chi and Flavell, 2005). Ces données confirment l'implication de S1PR1 dans le contrôle de la circulation des lymphocytes (Skoura and Hla, 2009).

## **S1PR2**

Le récepteur S1PR2, aussi appelé EDG5, est également exprimé par une large variété de types cellulaires. Contrairement à S1PR1, la déficience en S1PR2 n'induit pas d'anomalie anatomique ou physiologique apparente mais les souris développeraient des convulsions spontanées, sporadiques et occasionnellement létales à l'âge de 3-7 semaines (MacLennan *et al.*, 2001). Une étude plus récente a révélé que les souris déficientes en S1PR2, pour environ la moitié d'entre elles, développaient des lymphomes B à l'âge de 1,5-2 ans, révélant une susceptibilité particulière de ces souris pour ce type de néoplasie (Cattoretti *et al.*, 2009, p 2). Une surdité a également été décrite (Kono *et al.*, 2007 a) démontrant le rôle de ce récepteur dans le développement du système auditif. La double déficience en S1PR1 et S1PR2 entraîne une létalité embryonnaire entre E10,5 et E12,5, avec des hémorragies à E11,5 (Kono *et al.*, 2004).

S1PR2 est couplé aux protéines G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub> et G<sub>12/13</sub> (Hla *et al.*, 2001). Contrairement au S1PR1, la liaison de la S1P au S1PR2 inhibe Rac et le chimiotactisme induit par l'IGF-I (Okamoto *et al.*, 2000). Son expression est augmentée par les récepteurs Fc $\epsilon$ RI et requise pour la dégranulation des mastocytes mais inhibe leur migration vers l'antigène (Jolly *et al.*, 2004). L'activation de S1PR2 active ROCK/Rho et entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire contrairement au S1PR1

(Sanchez *et al.*, 2007). De façon générale, les effets engendrés par l'activation de S1PR2, comme l'inhibition de la migration cellulaire, s'opposent à ceux des S1PR1 et S1PR3 (Lepley *et al.*, 2005; Takuwa *et al.*, 2011).

### **S1PR3**

Le récepteur S1PR3, précédemment appelé EDG3, est un sous-type unique des récepteurs à la S1P car il est couplé aux protéines  $G_i$ ,  $G_q$  et  $G_{12/13}$  et à la petite GTPase Rho. Il est antagonisé par un composé anionique polycyclique, la suramine. Ce S1PR3 est exprimé dans le système vasculaire, les poumons, les reins, les intestins, la rate et le cartilage. Sa déficience chez la souris n'induit pas de phénotype particulier, suggérant une redondance fonctionnelle avec d'autres S1PRs. La double déficience en S1PR2 et S1PR3 se traduit par une létalité embryonnaire partielle (~50%) après E13,5, des portées de plus petite taille et des anomalies vasculaires mais sans phénotype particulier pour les souris qui survivent. Les doubles déficients en S1PR1 et S1PR3 ont un phénotype un peu plus sévère mais similaire aux simples déficients S1PR1<sup>-/-</sup> (Ishii *et al.*, 2002; Kono *et al.*, 2004). Par contre, la triple déficience en S1PR1, S1PR2 et S1PR3 a de lourds effets sur le système vasculaire et se traduit par une mort embryonnaire entre E10,5 et E11,5.

S1PR3 est un régulateur important de la perméabilité vasculaire via l'activation des protéines effectrices ROCK et Rho (Sanchez *et al.*, 2007). De plus, il a été démontré que S1PR3, exprimé dans les cardiomyocytes et les cellules musculaires lisses périvasculaires, jouait un rôle dans la régulation de la fréquence cardiaque (Forrest *et al.*, 2004).

### **S1PR4**

Contrairement aux récepteurs décrits jusqu'à présent, le S1PR4, initialement appelé EDG6, a tout d'abord été décrit comme ayant une expression limitée aux tissus et cellules du système hématopoïétiques et médiant les effets immunosuppresseurs de la S1P (Wang *et al.*, 2005). Toutefois, son ARNm a été détecté dans les poumons, thymus, rate, moëlle osseuse, appendice et leucocytes périphériques (Kluk and Hla, 2002). Ce récepteur est couplé aux sous-unités  $G_{\alpha_i}$  et  $G_{\alpha_{12/13}}$ . Sa stimulation entraîne l'activation sensible à la toxine pertussique de ERK1/2 et de la voie PLC/IP3/ $Ca^{2+}$  (pour revue (Strub *et al.*, 2010)). Une étude a montré que, dans des cellules de cancer mammaire MDA-MB-453 négatives pour le récepteur aux oestrogènes (ER-), le récepteur HER2 (human epidermal growth factor receptor 2)/ErbB2 interagissait fonctionnellement avec le S1PR4 et, suite à la liaison de S1P sur ce récepteur, activait ERK1/2 (Long *et al.*, 2010). Récemment, il a été rapporté qu'une forte expression de S1PR4 associée à une forte expression de SK1 était corrélée à un

mauvais pronostic pour les patients atteints d'une tumeur mammaire (Ohotski *et al.*, 2012). Cependant, les fonctions de S1PR4 restent encore très peu connues.

### **S1PR5**

Le S1PR5, ou EDG8, est principalement exprimé dans le cerveau, particulièrement dans les oligodendrocytes de la substance blanche (Im *et al.*, 2000; Terai *et al.*, 2003). Son expression a également été détectée dans la peau et la rate mais cela reste à confirmer. Comme tous les récepteurs à la S1P, celui-ci a une forte affinité pour ce lysophospholipide (Kd 2-6nM). Il serait couplé aux protéines G<sub>i</sub> et G<sub>12</sub> mais pas G<sub>q</sub> ou G<sub>s</sub>. La liaison de la S1P à ce récepteur induit une inhibition de ERK1/2 dépendante de phosphatases et résulte en un phénotype anti-prolifératif. Les souris déficientes en S1PR5 présentent une altération du trafic et de la mobilisation des cellules NK au niveau des sites d'inflammation (Walzer *et al.*, 2007), et une étude récente sur un autre modèle déficient en S1PR5 a indiqué que ce phénomène impliquait le facteur de transcription T-bet/Tbx21 au niveau de différents compartiments immunologiques (Jenne *et al.*, 2009).

#### **2.3.2. Action intracellulaire : les cibles de la S1P**

De nombreuses données plaident en faveur d'un rôle intracellulaire de la S1P, qui s'oppose aux effets pro-apoptotiques de son précurseur, le céramide. Ainsi, la SK1 jouerait un rôle crucial dans ce "rhéostat sphingolipidique". De plus, des études ont montré que la S1P pouvait induire une libération de calcium du RE, bien qu'aucune cible n'ait été clairement définie. Depuis près de vingt ans, aucune cible intracellulaire de la S1P n'avait été identifiée mais des travaux récents ont permis de montrer que la S1P était capable d'interagir avec plusieurs types de protéines intracellulaires et de moduler leur fonction.

*HDAC* - Bien que SK2 soit présente dans le noyau de nombreuses cellules, sa fonction au sein de ce compartiment était jusqu'alors inconnue. Récemment, il a été montré que les contenus nucléaires en sphingosine et S1P étaient abondants. De plus, SK2 se trouve dans un complexe répresseur avec l'histone H3 et des histone-déacétylases (HDACs), produisant de la S1P qui régule l'acétylation des histones au niveau de résidus lysine spécifiques et la transcription génique (Hait *et al.*, 2009). Bien que la S1P n'ait pas d'effet sur les histone-acétyl-transférases, elle peut se lier à HDAC1 et son homologue HDAC2 et les inhiber. L'inhibition de HDAC1/2 par la S1P est physiologiquement pertinente car SK2 a été détectée au niveau des promoteurs de l'inhibiteur des CDKs p21 et du régulateur transcriptionnel c-fos, où elle régule l'acétylation des histones et augmente leur transcription (Hait *et al.*, 2009). Ces résultats indiquent que la S1P produite dans le noyau par SK2

influence l'équilibre dynamique de l'acétylation des histones et ainsi la régulation épigénétique de gènes cibles spécifiques.

*TRAF2* - TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) est une protéine adaptatrice contenant un domaine RING qui est impliqué dans l'ubiquitination régulatrice de RIP1, événement critique dans l'activation de NF- $\kappa$ B en réponse au TNF $\alpha$  ; cependant, les tentatives visant à démontrer que TRAF2 est une E3 ligase pour RIP1 avaient jusqu'alors échoué. TRAF2 est connue pour se lier à SK1 et stimuler son activité (Xia *et al.*, 2002), mais le rôle de la S1P dans la voie canonique de NF- $\kappa$ B n'était pas clairement défini. Récemment, il a été découvert que la S1P serait un cofacteur manquant nécessaire pour l'activité E3 ligase de TRAF2 et, par conséquent, la polyubiquitination de RIP1 et l'activation de NF- $\kappa$ B (Alvarez *et al.*, 2010). De façon intéressante, seule la S1P et non la dihydroS1P, est capable de se lier à TRAF2 et l'activer, soulignant l'importance de la double liaison dans la S1P. Ceci explique pourquoi seule la S1P inhibe l'apoptose, malgré la capacité des deux lipides à se lier aux S1PRs. Ces données sont les premières à fournir une explication mécanistique des nombreuses observations révélant l'importance de SK1 et de la S1P dans les réponses cytoprotectrices, immunes et inflammatoires.

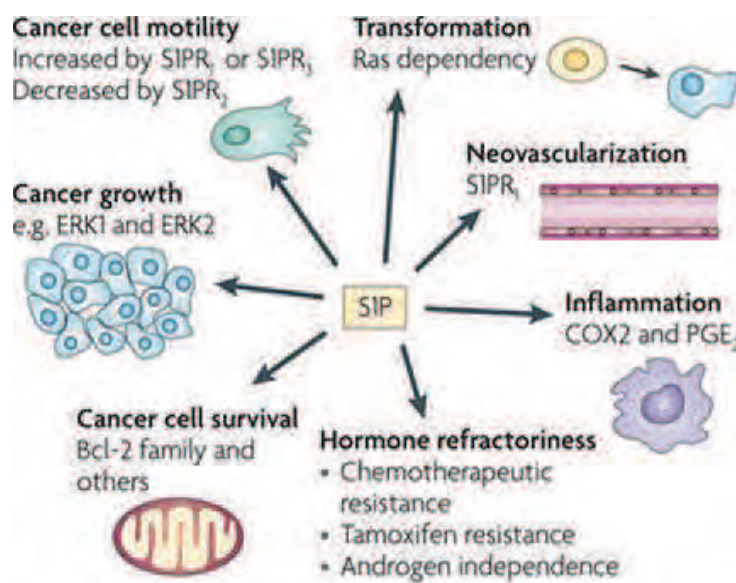
*PKC $\delta$*  - SK1 joue un rôle clé dans de nombreuses réponses immunes, incluant les septicémies. Des études s'intéressant aux mécanismes moléculaires ont révélé un rôle de PKC $\delta$  dans l'activation de NF- $\kappa$ B induite par des endotoxines. De plus, la S1P, ou la SK1 recombinante incubée en présence d'ATP et de sphingosine pour produire de la S1P, active une PKC $\delta$  recombinante humaine *in vitro* (Puneet *et al.*, 2010). Bien qu'aucune liaison directe n'ait été démontrée, ces données peuvent suggérer que la S1P est capable de se lier et d'activer PKC $\delta$  *in vivo*, et suggèrent que la SK1 pourrait être un élément moléculaire des voies de signalisation conduisant au choc septique.

*Prohibitine 2 (PHB2)* - PHB2 est une protéine hautement conservée qui régule l'assemblage et la fonction des mitochondries, et a récemment été montrée comme liant la S1P *in vitro* et *in vivo* (Strub *et al.*, 2011). PHB2 est localisée principalement dans le feuillet interne de la membrane mitochondriale et formerait un grand complexe avec PHB1, impliqué dans la biogenèse et le métabolisme mitochondriaux (Artal-Sanz and Tavernarakis, 2009). Cette étude a montré pour la première fois que SK2 serait aussi localisée à la mitochondrie, où elle produirait la majorité de la S1P mitochondriale. La respiration mitochondriale serait réduite chez les souris déficientes en SK2 et l'interaction de la S1P avec PHB2 serait importante pour l'assemblage du complexe cytochrome-c oxydase et la chaîne respiratoire mitochondriale. Cependant, le rôle de la S1P dans la fonction mitochondriale reste encore à élucider (pour revue (Maceyka *et al.*, 2012)).

*β-sécrétase (BACE1)* - L'activité de BACE1 ( $\beta$ -site amyloid precursor protein (APP) cleaving enzyme-1), enzyme limitante pour la production du peptide  $\beta$ -amyloïde, est modulée par la S1P dans les neurones. L'inhibition de SK1 et SK2 ou la surexpression d'enzymes de dégradation de la S1P entraînent une diminution de l'activité BACE1 et de la production de peptide  $\beta$ -amyloïde (Takasugi *et al.*, 2011). La S1P se lie aussi spécifiquement à BACE1 *in vitro* et augmente son activité protéolytique, suggérant que la S1P cellulaire pourrait moduler directement l'activité de cette  $\beta$ -sécrétase. De façon intéressante, la SK2 serait surexprimée dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, suggérant l'existence d'un rôle de la S1P et/ou SK2 dans la maladie d'Alzheimer.

## 2.4. Les fonctions biologiques de la S1P - implication dans le cancer

L'axe SK/S1P/S1PRs est impliqué dans la régulation de nombreux processus physiologiques et pathophysiologiques (pour revue (Maceyka *et al.*, 2012)). Notamment, en étant impliquée dans la survie et la prolifération cellulaires, dans l'échappement à l'apoptose, dans la migration, l'invasion ainsi que dans l'inflammation, l'angiogenèse et la lymphangiogenèse, la S1P joue un rôle important dans le cancer (Figure 27) (pour revue (Pyne and Pyne, 2010; Yester *et al.*, 2011)).



**Figure 27 - Actions de la S1P dans le cancer** (Pyne and Pyne, 2010).

La S1P a de multiples effets dans le cancer, incluant la transformation, la croissance, la survie, la motilité, la néovascularisation, la résistance hormonale et l'inflammation. COX, cyclooxygénase; PGE<sub>2</sub>, prostaglandine E<sub>2</sub>.

### 2.4.1. Rôle dans la survie et la prolifération cellulaires

De multiples études ont montré l'implication de la S1P dans la survie et la prolifération cellulaires (pour revue (Spiegel and Milstien, 2003)). Les premières, menées par le groupe de S.

Spiegel, décrivaient que l'ajout de S1P à des fibroblastes induisait la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire (Zhang *et al.*, 1991). La liste des cellules répondant à ce signal s'est considérablement allongée et inclut de nombreux types cellulaires comme les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires. Dans de nombreux systèmes, cette prolifération induite par la S1P est inhibée par des inhibiteurs de protéine G<sub>i</sub> comme la toxine pertussique (Goodemote *et al.*, 1995). Ces données soulignent l'importance de l'action extracellulaire de la S1P sur ses récepteurs et l'activation de voies de signalisation médiées par les protéines G.

Contrairement au céramide et à la sphingosine qui sont des inducteurs de mort cellulaire, la S1P inhibe l'apoptose induite par le céramide, le TNF $\alpha$ , Fas-ligand ou d'autres agents toxiques (Cuvillier *et al.*, 1996). Récemment, il a été montré que la S1P inhibait de façon Akt-dépendante le syndrome gastrointestinal aigü induit par l'apoptose des cellules endothéliales après irradiation (Bonnaud *et al.*, 2010), validant son rôle radioprotecteur dans les cellules endothéliales (Bonnaud *et al.*, 2007). La signalisation de mort dépendante de la libération du cytochrome-c et de Smac/DIABLO de la mitochondrie est également inhibée par l'ajout de S1P exogène sur des cellules leucémiques humaines (Cuvillier and Levade, 2001). Il a aussi été montré que la S1P extracellulaire augmentait l'expression de protéines anti-apoptotiques comme Mcl-1 et Bcl-2 alors qu'elle diminuerait l'expression de protéines pro-apoptotiques comme Bax et Bad. La S1P exogène stimulerait la phosphorylation de Bad, bloquerait la translocation de Bax à la mitochondrie, inhibant la libération de cytochrome-c et, par conséquent, bloquant l'activation des caspases (Betito and Cuvillier, 2006). De plus, des cellules transfectées par la SK1 ont une apoptose réduite alors que la surexpression de SPP entraîne une augmentation de la mort cellulaire parallèlement aux taux de céramide et sphingosine (Olivera *et al.*, 1999; Le Stunff *et al.*, 2002). D'autre part, plusieurs arguments plaident en faveur d'un rôle oncogénique de la SK1 : sa surexpression dans des cellules 3T3 induit la transformation de ces cellules via une voie de signalisation dépendante de Ras (Xia *et al.*, 2000) et elle est de plus surexprimée dans de nombreux cancers (Shida *et al.*, 2008) (Tableau 6). La surexpression de SK1 dans les cellules cancéreuses est souvent corrélée à un stade clinique avancé et à une résistance à la chimio- et à la radiothérapie. A l'inverse, l'inhibition de son activité augmente l'apoptose ou l'autophagie dans les cellules cancéreuses (Beljanski *et al.*, 2010; Taha *et al.*, 2006). Elle est activée par de nombreux stimuli qui entraînent sa surexpression et/ou sa translocation à la membrane et sa surexpression stable dans le cancer semble avoir lieu au niveau transcriptionnel en réponse à HIF1 $\alpha$ , aux oestrogènes et à d'autres facteurs de croissance (pour revue (Pitson, 2011) ; voir aussi le chapitre III-2.1.1.3.1.). Cependant, aucune mutation, translocation, ni amplification du gène *SK1* n'a jusqu'alors été rapportée, révélant la notion d'"addiction non oncogénique" des cellules cancéreuses pour SK1 proposée par Vadas et ses collaborateurs (Vadas *et al.*, 2008).

Human tissue	mRNA or protein	Number of samples	Comments	Refs
<b>SK expression</b>				
<b>Gastric</b>	mRNA	4	Increased in tumour compared with paired normal gastric tissue.	(Li <i>et al.</i> , 2009 b)
	Protein	175	65.7% of patients had high SK1 in the cancer lesion compared with adjacent normal tissue. Correlation of increasing SK1 expression and disease progression. Patient survival reduced when expression of SK1 is high	
<b>Breast</b>	mRNA	1269	SK1 increased in ER <sup>-</sup> tumours (test set = 171, validation sets = 1,098). Reduced disease-free survival time with high SK1 expression applies to whole patient cohort (both ER <sup>+</sup> and ER <sup>-</sup> patients) and also to ER <sup>+</sup> cohort. No significant correlation with tumour size, lymph node status or histological grading	(Ruckäberle, 2008)
<b>Lung</b>	Protein	25	Five carcinoid, ten squamous and ten adenocarcinoma samples. All had high SK1 expression compared with normal matched tissue	(Johnson, 2005)
<b>Astrocytoma</b>	mRNA	4	Increased compared with paired normal brain tissue	(Li, 2008)
	Protein	243	41.2% of astrocytoma biopsy samples had high SK1 expression. Correlation with histological tumour grade and reduced patient survival	
<b>Astrocytoma (grade 4)</b>	Protein	48	Patient survival reduced when expression of SK1 is high. No correlation with SK2	(Van Brocklyn <i>et al.</i> , 2005)
<b>Colon</b>	Protein	27	63% of patients had moderate or high SK1 in tumours compared with non-neoplastic tissue	(Kohno, 2006)
<b>Colon</b>	Protein	47	89% of colon cancers had increased SK1 expression compared with normal colon mucosa	(Kawamori <i>et al.</i> , 2009)
<b>Non-Hodgkin's lymphoma</b>	mRNA	69	Increased SK1 mRNA and protein in Non-Hodgkin's lymphoma (n = 44) compared with reactively lymphoid hyperplasia (n = 25)	(Bayerl, 2008)
	Protein	69	Trend of increasing SK with increasing clinical grade	
<b>Various</b>	mRNA	14–50	Increased SK1 mRNA in breast, colon, lung, ovary, stomach, uterus, kidney and rectal tumours compared with adjacent normal tissue	(French <i>et al.</i> , 2003)
<b>S1P-metabolizing enzymes</b>				
<b>Ovarian</b>	mRNA	87	Ovarian carcinoma (n = 20), metastatic ovarian carcinoma (n = 17), normal ovaries (n = 50). Increased in ovarian carcinoma compared with normal ovaries	(Hibbs, 2004)
<b>Ovarian</b>	mRNA	22	Increased in chemotherapeutic resistant ovarian cancer	(Bernardini, 2005)
<b>Colon</b>	mRNA	10	Eight of the ten samples had reduced S1P lyase mRNA compared with normal paired tissue	(Oskouian <i>et al.</i> , 2006)
<b>S1P receptors</b>				
<b>Astrocytoma</b>	Protein	48	S1PR <sub>1</sub> , S1PR <sub>2</sub> and S1PR <sub>3</sub> had no correlation with grade	(Van Brocklyn <i>et al.</i> , 2005)
<b>Glioblastoma</b>	mRNA and protein	38	Correlation of reduced S1PR <sub>1</sub> with reduced survival	(Yoshida, 2010 b)
<b>Glioma</b>	mRNA and protein	58	15 diffuse and 8 anaplastic astrocytoma and 35 glioblastoma. S1PR1 mRNA reduced in glioblastoma compared with normal brain and diffuse astrocytoma. S1PR <sub>1</sub> reduced in normal brain. Correlation of reduced S1PR <sub>1</sub> with reduced survival	(Yoshida, 2010 a)
<b>Lymphoma</b>	Gene	106	26% of diffuse large cell lymphomas had multiple somatic mutations in 5' sequence of S1PR2	(Cattoretti <i>et al.</i> , 2009)
<b>Leukaemia</b>	mRNA	43	31 patients with leukaemia compared with 12 normal. S1PR <sub>5</sub> overexpressed in large granular lymphocytes	(Kothapalli <i>et al.</i> , 2002)

**Tableau 6 - Dérégulation de la voie S1P dans le cancer (Pyne and Pyne, 2010).**



Il est toutefois intéressant de noter que, même si elles catalysent la même réaction, les SK1 et SK2 ont des fonctions cellulaires opposées. En effet, alors que la SK1 favorise la survie, la SK2 semble favoriser les réponses apoptotiques, soulignant l'importance de la localisation de production de S1P dans les effets biologiques engendrés (pour revue (Maceyka *et al.*, 2005)).

La régulation de l'apoptose cellulaire par la S1P fait partie des fonctions majeures de ce médiateur lipidique. Cependant, des études mécanistiques sont encore nécessaires afin de mieux comprendre ce phénomène important.

#### **2.4.2. Rôle dans l'autophagie**

L'autophagie est un processus physiologique de catabolisme au cours duquel les protéines et les organelles sont séquestrés dans des autophagosomes, dégradés et recyclés en réponse au stress cellulaire (Klionsky and Emr, 2000). L'induction de l'autophagie par un stress entraîne souvent la survie cellulaire en supprimant l'apoptose ; cependant, cela peut aussi mener à une mort cellulaire autophagique (Maiuri *et al.*, 2007). Lors de la progression de cancer, l'autophagie peut être activée en réponse à différents stress, tels que la déprivation en nutriments, la réponse UPR (unfolded protein), l'hypoxie et les traitements par des agents chimiothérapeutiques cytotoxiques (Daido *et al.*, 2004). Dans les stades précoces de croissance tumorale rapide, l'inhibition de l'autophagie permet le maintien de cytoplasme ample pour la division cellulaire ; cependant, lors de déprivation en oxygène et nutriments, associée aux stades plus tardifs de la croissance tumorale, augmente l'autophagie afin de protéger les cellules cancéreuses de l'apoptose. A la fois la S1P et le céramide peuvent induire l'autophagie, cependant leurs conséquences sur le devenir cellulaire sont très différentes (Lavieu *et al.*, 2007). L'augmentation des taux de céramide a été montré comme induisant une mort autophagique dans des cellules de cancer colique et mammaire (Lavieu *et al.*, 2007) ainsi que dans des cellules de gliome (Daido *et al.*, 2004) en stimulant l'induction de Beclin-1 et l'inhibition de la phosphorylation d'Akt (Lavieu *et al.*, 2007; Scarlatti *et al.*, 2004). Dans des cellules MCF7, le tamoxifène induirait l'autophagie et augmenterait les taux de céramide. Le blocage de la synthèse *de novo* de céramide réduirait l'autophagie induite par le tamoxifène alors que l'augmentation de ses pools intracellulaires la favoriserait (Scarlatti *et al.*, 2004). En revanche, contrairement à la mort autophagique médiée par le céramide, l'autophagie médiée par la S1P a été rapportée comme favorisant la survie cellulaire. Il a été montré que, dans des cellules MCF7, à la fois la surexpression de SK1 et l'inhibition de SPP1 stimulaient l'autophagie indépendamment de Beclin-1 et de mTOR (Lépine *et al.*, 2011 b). Ces travaux ont indiqué que, bien que l'autophagie induite par l'inhibition de SPP1 stimulait Akt, l'activation des S1PRs à la surface cellulaire n'entraînait pas l'autophagie, impliquant une action intracellulaire de la S1P (Lépine *et al.*, 2011 b). Cependant, une autre étude a

rapporté que la S1P extracellulaire pouvait médier l'autophagie via S1PR5 en condition de déprivation en sérum dans des cellules PC-3 de cancer de la prostate (Chang *et al.*, 2009) et promouvait la survie cellulaire (Huang *et al.*, 2011). Ainsi, l'autophagie médiée par la S1P favorise la survie des cellules cancéreuses, favorisant ainsi la progression tumorale.

#### **2.4.3. Rôle dans la migration, l'invasion et le processus métastatique**

La motilité et la capacité à dégrader la matrice extracellulaire sont deux composantes importantes des processus d'invasion et de dissémination métastatique des cellules cancéreuses. La S1P est impliquée dans la régulation de ces phénomènes et ses effets sur la migration cellulaire varient selon les modèles et dépendent des récepteurs mis en jeu (Brocklyn, 2010). Les premières études menées par Igarashi et ses collaborateurs ont décrit un effet inhibiteur de la S1P sur la migration de cellules de mélanome et de cellules musculaires lisses vasculaires (Bornfeldt *et al.*, 1995; Sadahira *et al.*, 1992). Des effets similaires ont été observés pour des cellules de glioblastome et ont été interprétés comme étant indépendants des S1PRs dans des cellules de cancer mammaire (Wang *et al.*, 1999). Par la suite, de nombreuses études ont rapporté un effet potentialisateur des lysophospholipides, LPA et plus particulièrement S1P, sur la migration de cellules endothéliales via l'activation de récepteurs couplés à la protéine  $G_i$ . De façon générale, les récepteurs S1PR1 et S1PR3 sont associés à un effet pro-migratoire alors que le S1PR2, qui a la capacité de se coupler à la protéine  $G_i$  mais a une préférence pour  $G_{12/13}$ , est associé à une inhibition de la migration cellulaire via l'activation de Rho et l'inhibition de Rac. Des modèles de dissémination consistant à injecter des cellules de mélanome dans la veine caudale de souris ont permis de valider ces effets *in vivo* en montrant que la formation de métastases diminuait lorsque S1PR2 était surexprimé alors qu'elle augmentait lors de la surexpression de S1PR1 (Yamaguchi *et al.*, 2003). D'autre part, il a été montré que, dans les cellules endothéliales, S1PR1 et S1PR3 étaient nécessaires pour induire la formation de contacts focaux avec assemblage des intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_5\beta_1$  et la migration cellulaire. S1PR1 serait plutôt impliqué dans l'assemblage cortical de l'actine dépendant de Rac et la formation de lamellipodes alors que S1PR3 contrôlerait Rho et les contacts focaux/fibres de stress (Paik *et al.*, 2001).

Par ailleurs, de nombreux travaux ont mis en évidence une communication entre la S1P et d'autres facteurs de croissance, incluant le PDGF, l'EGF, le VEGF et l'héréguline, avec transactivation réciproque des récepteurs et boucles d'amplification via la signalisation "inside-out" de la S1P (pour revue (Yester *et al.*, 2011)). Par exemple, l'activation de Rac ainsi que la migration de fibroblastes induite par le PDGF est dépendante de l'activation de la SK1, de la production et la sécrétion de S1P et de la stimulation du S1PR1 (Hobson *et al.*, 2001). Dans les fibroblastes et les cellules musculaires

lisses, les récepteurs S1PR1 et PDGFR $\beta$  ont été montrés comme formant un complexe fonctionnel de signalisation qui favorise la migration. De même, dans des cellules de cancer ovarien, S1PR3 transactiverait le PDGFR $\beta$ . Une coopération entre la S1P et l'EGF a aussi été mise en avant avec stimulation de l'EGFR par la S1P dans des cellules musculaires lisses et des cellules de cancer mammaire MDA-MB-231. Dans des cellules de cancer mammaire MCF-7 ainsi que dans des cellules de glioblastome, l'activation de l'EGFR induirait la translocation de SK1 à la membrane puis son activation nécessaire pour la migration. Une stimulation des cellules MCF-7 par des oestrogènes entraînerait une transactivation de l'EGFR via l'interaction S1P/S1PR3. Dans des cellules de cancer gastrique, la transactivation de l'EGFR par la S1P se ferait via un processus dépendant de S1PR2 et le relargage d'EGF, qui se fixerait ensuite à son récepteur pour l'activer. La S1P aurait également la capacité d'induire la sécrétion de VEGF-A et la transactivation du VEGFR2 dans des cellules de cancer folliculaire de la thyroïde, aboutissant à leur migration (Balthasar *et al.*, 2008). Dans des cellules de mélanome A7, l'héréguline, qui se lie aux récepteurs ERBB3 et ERBB4, stimule l'activité de SK1 et la production de S1P. L'héréguline induit également la co-localisation de S1PR1, SK1, filamine A et PAK1 (p21 protein-activated kinase 1) au niveau des renflements membranaires. La S1P régulerait la migration cellulaire en réponse à l'héréguline en stimulant directement l'activité de PAK1 *in vitro* (Maceyka *et al.*, 2008).

Enfin, il a été montré que la S1P était impliquée dans la régulation de l'invasion cellulaire et de dissémination métastatique *in vivo* dans des modèles de gliome (Van Brocklyn *et al.*, 2003), de lymphome T (Stam *et al.*, 1998) et de tumeurs de Wilms (Li *et al.*, 2009 a). Ces effets sont médiés via l'activation ou la sécrétion de protéases, incluant les métalloprotéases matricielles et les composants du système activateur du plasminogène. Ainsi, des études ont montré que la S1P était capable d'augmenter l'expression de l'activateur du plasminogène de type urokinase, uPAR et PAI-1 ainsi que celle de MMP2 (Bryan *et al.*, 2008; Devine *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2009). De façon surprenante, alors que S1PR2 inhibe généralement la motilité, ce récepteur augmenterait les capacités d'invasion de cellules de gliome. S1PR2 augmenterait l'expression de CCN1/Cyr61, molécule connue pour augmenter la motilité cellulaire, l'invasion, l'adhésion et l'angiogenèse (Young *et al.*, 2009). De plus, le S1PR2 augmenterait l'expression de uPAR et PAI-1, qui sont nécessaires à l'invasion de cellules primaires GBM6 et GBM12 et de la lignée cellulaire de gliome U373 (pour revue (Brocklyn, 2010; Yester *et al.*, 2011)). Récemment, une étude a mis en évidence que la S1P, en interagissant avec son récepteur S1PR3 couplé à une protéine G $_{\alpha q}$ , régulait l'induction de MMP-9 et l'invasivité de cellules épithéliales mammaires MCF10A à la fois *in vitro* et *in vivo*. Le facteur de transcription fos jouerait un rôle crucial dans l'induction transcriptionnelle de MMP-9 par la S1P et l'activation de ERK1/2, p38 et Akt ainsi que de la phospholipase C- $\beta_4$  et la libération de calcium intracellulaire seraient impliquées

dans la surexpression de cette métalloprotéase matricielle et l'invasion des cellules mammaires (Kim *et al.*, 2011).

La S1P contribuerait à l'invasion cellulaire par de multiples mécanismes au-delà de la régulation de la motilité cellulaire, incluant la régulation de protéases et de protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire (Yester *et al.*, 2011).

#### **2.4.4. Rôle dans le système immunitaire, le réseau cytokinique et l'inflammation**

La S1P, en tant que médiateur lipidique multipotent, est aussi impliquée dans la régulation de l'immunité, que ce soit à travers le trafic des lymphocytes ou dans la signalisation des cytokines pro- et anti-inflammatoires (pour revue (Chi, 2011; Spiegel and Milstien, 2011; Xia and Wadham, 2011)).

En effet, il est maintenant clairement établi que l'axe S1P-S1PR1 contrôle le trafic et la migration de nombreuses cellules immunes incluant les lymphocytes T et B, cellules NK, cellules dendritiques, macrophages, neutrophiles, progéniteurs hématopoïétiques, mastocytes et ostéoclastes. Les premières études ayant montré l'implication de la S1P dans le trafic lymphocytaire ont été réalisées avec un analogue de la sphingosine, le FTY720 (aussi appelé Fingolimod), qui peut être phosphorylé par SK2 *in vivo* et agir comme ligand des S1PRs. Cet immunosuppresseur induit une lymphopénie lorsqu'il est injecté chez l'animal (Allende *et al.*, 2004). De plus, la déficience conditionnelle en S1PR1 dans les cellules hématopoïétiques ainsi que dans les lymphocytes T empêche la circulation des thymocytes et lymphocytes depuis le thymus dû à un défaut de réponse chimiotactique à la S1P (Matloubian *et al.*, 2004).

De nombreux travaux ont permis de démontrer que la S1P pouvait moduler les fonctions de cellules immunes à la fois naïves et activées. L'expression de la SK est abondante dans ces cellules, notamment dans les mastocytes, les cellules monocytaires et les neutrophiles. En retour, ces cellules sécrètent de la S1P qui peut alors agir de façon autocrine et/ou paracrine en interagissant avec ses récepteurs (pour revue (Spiegel and Milstien, 2011)). Elle a ainsi été impliquée dans la signalisation inflammatoire, notamment via le TNF $\alpha$  et le TGF- $\beta$ .

*TNF $\alpha$*  - Des études ont permis de documenter le rôle important de l'axe SK1/S1P dans la signalisation du TNF $\alpha$  via l'interaction avec le complexe TNFR passant par TRAF2 et l'activation de NF $\kappa$ B. Par exemple, la S1P serait impliquée dans l'expression de molécules d'adhésion induite par le TNF $\alpha$ , incluant VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), IAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) et la sélectine-E dans des cellules endothéliales (Xia *et al.*, 1998). De plus, le blocage de la voie SK1/S1P

par des approches génétiques ou des inhibiteurs pharmacologiques induit une inhibition d'effets médiés par le TNF $\alpha$  comme la production d'anion superoxide, l'expression de cyclo-oxygénase 2 (COX2) et la formation de PGE2, ainsi que la production d'autres cytokines/chimiokines comme IL8, IL6, RANTES et MCP-1 (pour revue (Xia and Wadham, 2011)). Notamment, la voie COX2/PGE2, voie la plus étudiée et considérée comme régulateur important de l'inflammation dans le cancer du colon, serait induite par la voie SK1/S1P dans les tumeurs coliques humaines. La déficience en SK1 se traduirait par une diminution d'expression de COX-2 et de la carcinogénèse colique induite par un traitement AOM/DSS (azoxyméthane/dextran sodium sulfate) *in vivo*, révélant l'implication de la voie SK1/S1P dans l'inflammation associée à ce type de cancer (Kawamori *et al.*, 2009, 2006).

*TGF- $\beta$*  - Une étude a tout d'abord montré que le TGF- $\beta$  avait une action inhibitrice sur les activités SK basale et induite par le TNF $\alpha$ , et que cette inhibition contribuait à son effet anti-inflammatoire dans les cellules endothéliales (Gamble and Vadas, 1988). Par ailleurs, dans de nombreux types de fibroblastes, le TGF- $\beta$  exercerait des activités pro-inflammatoires et mitogéniques favorisant la fibrose. Plusieurs études ont rapporté que cet effet pro-inflammatoire était médié, au moins en partie, par les S1PRs à la surface cellulaire et était associé à la surexpression de SK1 induite par le TGF- $\beta$ . De plus, la S1P serait un médiateur de la régulation transcriptionnelle de TIMP-1, du remodelage de la MEC, de l'expression du CTGF et de la production de collagène induits par le TGF- $\beta$  (pour revue (Xia and Wadham, 2011)). Ainsi, il existe une interaction bi-directionnelle entre les voies de la S1P et du TGF- $\beta$ .

#### **2.4.5. Rôle dans l'hypoxie, l'angiogénèse et la lymphangiogénèse**

La S1P est abondamment produite et libérée par les cellules sanguines et ses récepteurs sont exprimés dans les tissus cardiovasculaires tels que les artères, les veines, le cœur et les petits vaisseaux. Ainsi, les récepteurs à la S1P régulent d'importantes fonctions physiologiques du système vasculaire, comme la morphogénèse et la maturation vasculaires, la fonction cardiaque, la perméabilité vasculaire et l'angiogénèse tumorale (pour revue (Hla, 2003)). L'endothélium est très sensible à la stimulation par la S1P *in vitro*, résultant en l'induction de la prolifération, de la migration et de la survie des cellules endothéliales, ainsi qu'à la morphogénèse vasculaire via la formation de réseaux capillaires (Lee *et al.*, 1999). La S1P exercerait son pouvoir chimioattractant sur les cellules endothéliales par activation de la voie PI3K/Akt et phosphorylation du S1PR1 par Akt, entraînant l'induction de la petite GTPase Rac (Lee *et al.*, 2001). Dans des modèles *in vivo* d'angiogénèse en matrigel, la S1P coopère avec des inducteurs connus de l'angiogénèse comme le VEGF et le FGF et induit la formation de néovaisseaux. Ces données suggèrent donc un rôle de la S1P dans la régulation de l'angiogénèse.

L'angiogénèse est un mécanisme d'adaptation à un état physiologique présentant un besoin accru en oxygène et nutriments, résultant en la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dérivés du réseau circulatoire existant (Carmeliet and Jain, 2011). L'angiogénèse est donc critique pour la croissance et la propagation d'une tumeur au-delà de la taille limite de diffusion. En réponse à l'hypoxie, les cellules vont initier une réponse en partie médiée par les facteurs HIFs (Majmundar *et al.*, 2010). Une étude a montré que l'expression de SK1 et de SK2 augmentait lors d'une hypoxie prolongée dans des cellules musculaires lisses (Ahmad *et al.*, 2006). De plus, comme évoqué précédemment, l'expression de SK1 est régulée transcriptionnellement par HIF1 et HIF2 $\alpha$  via les éléments de réponse HRE présents au niveau de son promoteur (Anelli *et al.*, 2008; Schwalm *et al.*, 2008), alors que les mécanismes régulant l'expression de SK2 sont méconnus. L'hypoxie induit le relargage de S1P par les cellules tumorales, incluant des cellules de gliome (Anelli *et al.*, 2008), de prostate, de cancer mammaire (Ader *et al.*, 2008) et des cellules d'adénocarcinome pulmonaire (Schnitzer *et al.*, 2009). La S1P libérée est un puissant facteur pro-angiogénique qui stimule l'angiogénèse directement (Liu *et al.*, 2001), et indirectement via l'activation de l'expression du VEGF (Heo *et al.*, 2009). La surexpression du VEGF induite par la S1P est médiée par ZNF580, facteur de transcription à doigt de zinc C2H2 important dans l'angiogénèse (Sun *et al.*, 2010). Inversement, la stimulation du VEGF induit la transcription de l'ARNm du S1PR1 (Igarashi *et al.*, 2003); ainsi le VEGF et la S1P agissent dans une boucle de régulation réciproque promouvant le développement *de novo* de vaisseaux sanguins. Les effets angiogéniques de la S1P sont médiés non seulement par le S1PR1 mais également par le S1PR3 (Liu *et al.*, 2001; Schnitzer *et al.*, 2009). Comme décrit précédemment, le S1PR1 est essentiel pour la maturation vasculaire, phénomène par lequel les cellules murales (cellules musculaires lisses et péricytes) recouvrent et stabilisent les vaisseaux endothéliaux néoformés, et son absence est létale embryonnaire (Liu *et al.*, 2000 b). D'un point de vue mécanistique, le S1PR1 favorise la formation de jonctions basées sur la N-cadhérine entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Paik *et al.*, 2004). Le knockdown de S1PR1 dans les cellules endothéliales empêche la croissance de néovaisseaux dans des implants sous-cutanés de Matrigel et réprime la stabilisation vasculaire et l'angiogénèse de tumeurs établies, entraînant l'inhibition de leur croissance (Chae *et al.*, 2004). De façon intéressante, le knockdown de S1PR1 diminue l'expression PECAM1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1) et de VE-cadhérine, qui sont des molécules importantes pour l'adhésion des cellules endothéliales et la formation de jonctions intercellulaires, respectivement (Krump-Konvalinkova *et al.*, 2005). A l'inverse, l'activation du S1PR2 dans les cellules endothéliales entraîne une perturbation des jonctions adhérentes et augmente la perméabilité paracellulaire (Kupperman *et al.*, 2000). Aussi, des mutations du gène codant pour l'orthologue du S1PR2 chez le poisson-zèbre se traduisent par des anomalies du développement cardiaque dues à un défaut de migration des précurseurs de cardiomyocytes,

révélant l'implication de ce récepteur dans l'organogénèse cardiaque. D'autre part, l'importance des S1PRs dans l'angiogénèse est également corroborée par les données ayant révélé l'activité anti-angiogénique du FTY720. En effet, il a été montré que le FTY720 inhibait l'angiogénèse et la croissance tumorales et augmentait l'apoptose dans un modèle murin de mélanome (LaMontagne *et al.*, 2006). De plus, la séquestration de la S1P circulante par l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-S1P inhibe la tumorigénèse et l'angiogénèse tumorale dans des modèles d'allogreffes et de xéno-greffes de tumeurs chez la souris (Visentin *et al.*, 2006).

Par ailleurs, la délétion de SK1 de façon spécifique dans les cellules endothéliales lymphatiques (LECs) des souris déficientes en SK2 (*Sphk2*<sup>-/-</sup>) inhibe la maturation des vaisseaux lymphatiques, soulignant la nécessité de SK1 et S1P dans les LECs pour le bon développement des vaisseaux lymphatiques (Pham *et al.*, 2010). Plusieurs études ont permis de montrer que la S1P stimulait la lymphangiogénèse dans des modèles à la fois *in vitro* et *in vivo* (Anelli *et al.*, 2010; Nagahashi *et al.*, 2012; Yoon *et al.*, 2008). *In vitro*, la S1P induirait la lymphangiogénèse via l'expression du S1PR1 dans les LECs. Les cellules tumorales, qui sont caractérisées par de hauts niveaux d'expression de SK1, peuvent libérer de la S1P dans le milieu extracellulaire, pouvant alors induire l'angiogénèse et la lymphangiogénèse de façon paracrine (Anelli *et al.*, 2010; Takabe *et al.*, 2008). L'étude de Yoon et ses collaborateurs a montré que la S1P induisait une mobilisation du calcium intracellulaire et la formation de fibres de stress d'actine dans des LECs humaines de façon dépendante de la toxine pertussique/phospholipase C (Yoon *et al.*, 2008). Anelli et ses collaborateurs ont montré que la S1P pouvait induire *in vitro* la formation de tubes endothéliaux et la migration cellulaire à partir de lignées de cellules endothéliales dérivées des systèmes vasculaire et lymphatique à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Anelli *et al.*, 2010). Plus récemment, le groupe de K. Takabe a publié une étude montrant l'importance de la S1P générée par la SK1 à la fois pour la progression tumorale et pour l'angiogénèse et la lymphangiogénèse induite par la tumeur dans des modèles de cancer mammaire (Nagahashi *et al.*, 2012). En utilisant un modèle syngénique et orthotopique de cancer mammaire murin, le même groupe a montré que l'utilisation de S1P exogène augmentait l'angiogénèse et la lymphangiogénèse alors qu'un inhibiteur spécifique de SK1 réduisait la croissance tumorale et les métastases ganglionnaires lymphatiques et pulmonaires (Nagahashi *et al.*, 2012). Aussi, l'inhibition pharmacologique de SK1 a permis d'indiquer que la S1P était impliquée dans l'angiogénèse et la lymphangiogénèse non seulement au niveau de la tumeur primaire mais également dans les ganglions lymphatiques distants de la tumeur.

## 2.5. Approches thérapeutiques visant la signalisation de la S1P

Compte tenu de l'étendue des fonctions biologiques dans lesquelles est impliquée la S1P, des stratégies pharmacologiques visant à prévenir la progression tumorale en inhibant la biosynthèse de ce sphingolipide bioactif, en augmentant son catabolisme ou en modulant la signalisation de ses récepteurs semblent prometteuses et pourraient renforcer considérablement l'arsenal des chimiothérapies adjuvantes anticancéreuses (pour revue (Shida *et al.*, 2008)).

### 2.5.1. Stratégies visant les récepteurs

Les techniques de modélisation moléculaire et les études de mutagenèse ont permis d'identifier les acides aminés des récepteurs S1PR1 et S1PR4 interagissant spécifiquement avec le groupement phosphate, le fragment ammonium et la chaîne hydrophobe de la S1P. De même, six acides aminés spécifiques ont été identifiés pour leur importance dans la transition conformationnelle du S1PR1 sous un état activé (Fujiwara *et al.*, 2007; Inagaki *et al.*, 2005; Parrill *et al.*, 2000). De telles études permettent d'évaluer *in silico* des banques de composés chimiques afin d'identifier des agents chimiques et d'élaborer des stratégies thérapeutiques innovantes.

#### a) Agonisme

Après avoir été testé et validé thérapeutiquement dans le traitement de scléroses multiples, le FTY720 (ou Fingolimod) a été approuvé par la FDA (Gilenya™). Cet agent immunosuppresseur analogue de la sphingosine est capté par les cellules, phosphorylé par SK2 puis libéré sous cette forme (FTY720-P). Il peut alors se fixer et activer les récepteurs S1PR1, S1PR3, S1PR4 et S1PR5 mais pas le S1PR2, et induire une lymphopénie, inhibant ainsi l'attaque du système nerveux central par les lymphocytes pathogènes (Brinkmann *et al.*, 2010). Cependant, d'autres actions du FTY720 dans les scléroses multiples, comme la capacité de réduire le relargage de cytokines pro-inflammatoires par les astrocytes ont aussi été rapportées (Choi *et al.*, 2011 a). De façon intéressante, le FTY720 induit un "antagonisme fonctionnel" du S1PR1 par sa rapide polyubiquitination, endocytose et dégradation protéasomale (Gräler and Goetzl, 2004), justifiant que le FTY720 soit considéré et utilisé à la fois comme un agoniste et un antagoniste des S1PRs. Ce mécanisme pourrait contribuer à l'apoptose sélective des cellules cancéreuses induite par le FTY720 de façon Bcl-dépendante (Azuma *et al.*, 2003) et à l'inhibition de la vascularisation et de l'angiogenèse tumorales (LaMontagne *et al.*, 2006). Cependant, la lymphopénie est aussi induite par un agoniste spécifique du S1PR1, le SEW2871, qui n'entraîne pas la déplétion de ce récepteur dans les cellules (Jo *et al.*, 2005). L'utilisation du SEW2871 *in vivo* a été aussi associée à une atténuation des lésions d'ischémie-reperfusion rénales, une réduction du trafic et de l'infiltration des éosinophiles aux sites d'inflammation cutanée, et à une



diminution de l'apoptose et une amélioration de la fonction cardiaque après infarctus du myocarde, démontrant le large potentiel du ciblage du S1PR1 (pour revue (Pyne and Pyne, 2011) ; c'est pourquoi, de nombreux agonistes sélectifs du S1PR1 continuent à être développés. Le AUY954, un analogue aminocarboxylate du FTY720, induit une lymphopénie et augmente la survie d'allogreffes cardiaques lors de transplantation chez le rat (Pan *et al.*, 2006). Le CYM-5442 induit et maintient une lymphopénie chez le rat en se liant à une poche hydrophobe putative du S1PR1 (Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2008). Le KRP-203, analogue du FTY720, est un agoniste sélectif du S1PR1 après phosphorylation qui augmente le succès de transplantation et diminue les effets autoimmuns (Shimizu *et al.*, 2005). De façon intéressante, le KRP-203 n'induit pas de bradycardie médiée par le S1PR3 qui est un effet secondaire observé avec le FTY720. Le FTY720 active sélectivement les voies S1PR3 couplées aux protéines G<sub>i</sub> et antagonise la signalisation S1PR3-G<sub>q</sub> en réponse à la S1P, suggérant que la stabilisation des différentes conformations de S1PR3-protéine-G par le FTY720 dépend de l'identité de la protéine-G (Sensken *et al.*, 2008).

D'autres agonistes spécifiques de récepteurs à la S1P ont été rapportés et incluent les composés membres des séries VPC. Par exemple, les VPC24191 et VPC23153 sont des agonistes du S1PR1 et S1PR3 (Lynch and Macdonald, 2008).

## **b) Antagonisme**

Plusieurs antagonistes spécifiques de sous-types de récepteurs à la S1P sont actuellement disponibles. Par exemple, le VPC23019, antagoniste des S1PR1 et S1PR3, a été utilisé pour démontrer l'implication du S1PR1 dans les effets neuroprotecteurs post-ischémiques du FTY720 (Hasegawa *et al.*, 2010) ou après administration d'isoflurane dans des modèles d'accidents cardio-vasculaires (Zhou *et al.*, 2010), ainsi que dans la cardioprotection du pré- et post-conditionnement ischémique par la S1P endogène dans des cœurs de rats *ex vivo* (Vessey *et al.*, 2009). En utilisation thérapeutique, il apparaît que les résultats observés dépendent du mode d'administration. Par exemple, l'administration vasculaire, et non par voie aérienne, du W146 ou du VPC44116 entraîne un œdème pulmonaire à cause d'une augmentation de la fuite basale de l'endothélium pulmonaire (Sanna *et al.*, 2006), le VPC44116 en intra-péritonéal réduit les lésions induites par une hyperplasie néointimale (Wamhoff *et al.*, 2008). Ainsi, les antagonistes de S1PR1 ont un potentiel thérapeutique certain mais leur utilisation nécessite des précautions. D'autres exemples d'antagonistes du S1PR1 incluent les dérivés de CL2 (chemical lead 2), qui inhibe l'angiogenèse induite par le VEGF et l'œdème dans l'arthrite induite par l'anti-collagène de type II (Yonesu *et al.*, 2009), ainsi que le "composé" qui réduit l'hypotension induite par la S1P (Yonesu *et al.*, 2010).

Le JTE-013 est largement utilisé *in vitro* comme antagoniste du S1PR2 et est efficace *in vivo*, réduisant l'apoptose de cellules  $\beta$ -pancréatiques induite par la streptozotocine et l'incidence de diabètes (Imasawa *et al.*, 2010), ainsi que les réponses anaphylactiques déclenchées par les IgE (Oskeritzian *et al.*, 2010). Une étude récente a rapporté que le JTE-013 antagonisait également le S1PR4 de façon importante dans les cellules de cancer mammaire MDA-MB-453 qui sont positives pour HER2 et négatives pour le récepteur aux œstrogènes (Long *et al.*, 2010).

L'antagonisme des récepteurs à la S1P limite l'action extracellulaire de la S1P et représente un potentiel thérapeutique important dans la pathologie humaine.

## **2.5.2. Stratégies visant les enzymes du métabolisme de la S1P**

### **a) Sphingosine Kinase**

L'inhibition de la production de S1P par ciblage de la SK est une stratégie thérapeutique alternative. L'inhibition de SK1 et/ou SK2 devrait limiter la biodisponibilité de la S1P et sa contribution à la pathologie via les mécanismes intra- et/ou extracellulaires décrits précédemment. Cela doit aussi jouer indirectement sur les autres métabolites sphingolipidiques tels que la sphingosine et le céramide. Comme exposé précédemment, la S1P joue un rôle important dans l'inflammation et par conséquent, les inhibiteurs de SK1 sont de potentiels agents anti-inflammatoires. D'autre part, le ciblage de la SK1 est d'un intérêt particulier dans les pathologies tumorales (Pchejetski *et al.*, 2011; Shida *et al.*, 2008). Les inhibiteurs de SK sensibilisent les cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques et à l'irradiation, en réduisant l'activité SK et augmentant les taux de céramide, favorisant ainsi la mort par apoptose de ces cellules (pour revue (Pyne and Pyne, 2010)).

Plusieurs inhibiteurs de SK ont été identifiés. Par exemple, le Ski [ou SKI-II, 2-(p-Hydroxyanilino)-4-(p-chlorophenyl) thiazole] réduit la S1P intracellulaire, inhibe la prolifération et induit l'apoptose dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (French *et al.*, 2003). D'autres travaux ont ensuite montré que lorsqu'il était administré par voie orale, le Ski pouvait inhiber la croissance tumorale (French *et al.*, 2006), supprimer la colite ulcéreuse (Maines *et al.*, 2008) et réduire l'hyperréactivité bronchique (Chiba *et al.*, 2010). Plus récemment, le composé ABC294640 (3-(4-chlorophenyl)-adamantane-1-carboxylic acid (pyridin-4-ylmethyl)amide) a été identifié comme inhibiteur de SK2 pouvant bloquer la prolifération tumorale et la migration *in vitro*. Il s'agit également d'un agent biodisponible par voie orale, efficace *in vivo*, (Beljanski *et al.*, 2010; French *et al.*, 2010), qui induit la mort des cellules tumorales par autophagie.

Il a été montré que plusieurs inhibiteurs de l'activité catalytique de SK1, comme le Ski, le FTY720 et le (S)-FTY720 vinylphosphonate, induisaient une dégradation protéasomale de SK1 en partie via un mécanisme dépendant du céramide (Loveridge *et al.*, 2010).

#### **b) SPL**

L'inhibition de la SPL semble avoir un bénéfice particulier dans la modulation immunitaire étant donné qu'elle permet de maintenir des faibles taux de S1P dans les organes lymphoïdes (Schwab *et al.*, 2005; Schwab and Cyster, 2007). Par conséquent, des inhibiteurs de SPL pourraient être utiles en thérapies adjuvante ou alternative pour le traitement de maladies auto-immunes comme la sclérose en plaques, les diabètes de type 1 et l'arthrite rhumatoïde. En effet, les analogues synthétiques du tétrahydroxybutylimidazole (un colorant alimentaire du caramel), inhibiteurs de la SPL, appelés LX2931 et LX2932, sont efficaces par voie orale dans des modèles d'arthrite rhumatoïde chez les rongeurs et ont passé avec succès la phase I d'essais cliniques (Bagdanoff *et al.*, 2010). D'autre part, il a été montré qu'un prétraitement avec le THI avait un effet cardioprotecteur dans un modèle murin d'ischémie/reperfusion cardiaque (Bandhuvula *et al.*, 2011). Des études ont également révélé un rôle suppresseur de tumeur de la SPL (Colié *et al.*, 2009; Oskouian *et al.*, 2006), soulignant l'intérêt biologique de cette enzyme comme cible thérapeutique (Bandhuvula and Saba, 2007; Fyrst and Saba, 2008; Kumar and Saba, 2009).

## OBJECTIF GENERAL DE LA THESE

### Sphingolipides et S1P dans le mélanome

Les sphingolipides, lipides intra-épidermiques structurant les membranes cellulaires, sont essentiels dans la peau où ils sont synthétisés en abondance par les kératinocytes et jouent la fonction de barrière en agissant sur la cohésion cornéocytaire, le maintien et le contrôle de l'hydratation de la peau (Elias and Menon, 1991; Holleran *et al.*, 2006). Hormis pour les formes glycosylées qui s'exposent à la surface des cellules tumorales, peu d'éléments existent quant au rôle des SLs dans la progression et la formation des tumeurs cutanées. Toutefois, la combinaison de sorafenib avec des liposomes de céramide augmenterait l'efficacité anti-tumorale de ce traitement à la fois sur des cellules de mélanome en culture et sur des modèles de tumeurs xéno greffées chez la souris (Tran *et al.*, 2008). Aussi, une étude a montré que la myriocine, inhibiteur de sérine palmitoyl-transférase, inhibait la croissance tumorale dans un modèle de mélanome murin (Lee *et al.*, 2012). De plus, la résistance de lignées de mélanome humain à l'apoptose induite par divers stress a été associée à des taux intracellulaires en S1P élevés et inversement diminués pour le céramide (Bektas *et al.*, 2005).

### S1P dans le microenvironnement tumoral

Plusieurs études ont rapporté l'importance du rôle des lysophospholipides dans le microenvironnement tumoral. Notamment, la S1P produite et sécrétée par de nombreux types cellulaires dont les cellules cancéreuses contribue à la transformation, la prolifération et la migration des cellules tumorales mais également à l'angiogenèse tumorale (pour revue (Spiegel and Milstien, 2003)). Un rôle de marqueur oncogénique lui a même été attribué dans un modèle de cancer colique chez le rat (Kawamori *et al.*, 2009). D'autre part, la neutralisation de sa forme circulante par un anticorps monoclonal spécifique de ce sphingolipide a démontré des effets inhibiteurs significatifs sur la croissance et la vascularisation tumorales dans plusieurs modèles de cancers, dont le mélanome (Visentin *et al.*, 2006). Des effets similaires ont été obtenus par une approche utilisant le FTY720, antagoniste fonctionnel connu des S1PRs (LaMontagne *et al.*, 2006). Enfin, il existe une interconnexion entre la signalisation de la S1P et celle de nombreux facteurs de croissance, dont le TGF- $\beta$ , décrit pour son rôle majeur dans les interactions mélanome-stroma (Yamanaka *et al.*, 2004).

L'ensemble de ces données souligne le rôle de la S1P dans le microenvironnement tumoral par son action extracellulaire, qu'elle peut mener de façon autocrine et/ou paracrine sur l'ensemble des cellules formant "l'organe" tumoral.

### **Objectif des travaux**

L'objectif de ces travaux de thèse était de tester l'hypothèse selon laquelle la S1P générée dans les cellules tumorales et/ou stromales, et plus particulièrement les fibroblastes stromaux, pourrait influencer le développement du mélanome.



# RESULTATS EXPERIMENTAUX

---





# 1. Etude du rôle de la SK1 dans la stromagenèse et la progression du mélanome

## Contexte de l'étude

Le mélanome, la tumeur cutanée la plus agressive, détient le triste record du cancer ayant la plus forte progression depuis 20 ans et est devenu un problème majeur de santé publique. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation et la progression de cette tumeur connaît d'énormes progrès depuis quelques années, cependant le pronostic associé aux formes avancées de la maladie reste sombre (Flaherty, 2012).

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle prépondérant du microenvironnement dans le développement du mélanome. Plus particulièrement, les fibroblastes présents dans le stroma tumoral acquièrent un phénotype "activé" suite à une communication étroite et réciproque établie avec les cellules cancéreuses via des échanges moléculaires. Cette activation se traduit notamment par l'acquisition de marqueurs myofibroblastiques comme l' $\alpha$ -SMA et par la production et sécrétion de facteurs de croissance, de composants de la matrice extracellulaire et de protéases matricielles, modulant ainsi le phénotype tumoral. Ainsi, les fibroblastes sont capables de favoriser la progression du mélanome en promouvant la croissance tumorale mais également la résistance aux agents chimiothérapeutiques (Flach *et al.*, 2011). Les mécanismes moléculaires de ces interactions ne sont toutefois pas encore clairement établis.

La S1P, "oncolipide" aux fonctions multiples, est connue pour sa capacité à agir de façon intracellulaire mais également, et surtout, de façon extracellulaire via l'interaction avec ses récepteurs les S1PRs. Une fois libérée à l'extérieur de la cellule, elle a la possibilité d'induire des effets autocrines directement sur les cellules qui la produisent, ou paracrines sur les cellules adjacentes (Alvarez *et al.*, 2007). Ces propriétés, récemment mises en évidence dans le mélanome (LaMontagne *et al.*, 2006; Visentin *et al.*, 2006), font de la S1P un médiateur lipidique potentiel dans la communication mélanome-stroma. D'autre part, notre équipe a montré que l'expression de la SPL, enzyme de dégradation de la S1P, était diminuée dans des lignées cellulaires de mélanome en comparaison avec des mélanocytes sains (Colié *et al.*, 2009), suggérant une accumulation de ce lipide dans les cellules malignes.

Notre étude a donc cherché à déterminer le rôle de la S1P produite par les cellules tumorales et/ou stromales sur le développement du mélanome. Pour cela, nous avons tout d'abord évalué l'état de production de S1P dans le mélanome en analysant l'expression des enzymes de son métabolisme à la fois dans des lignées cellulaires de mélanome et dans des tissus issus de patients. Des approches pharmacologiques et génétiques nous ont permis d'appréhender les mécanismes

moléculaires mis en jeu dans la régulation de la SK1, puis d'établir les effets de la modulation de son expression sur la migration des cellules de mélanome. Nous avons également évalué l'impact de ces modifications sur le phénotype de fibroblastes cutanés après co-incubation. D'autre part, la modulation de la voie SK1/S1P dans les fibroblastes cutanés a permis d'évaluer ses effets sur le potentiel migratoire des cellules tumorales. Enfin, les différentes observations concernant le rôle de cette voie SK1/S1P dans la communication mélanome-stroma ont été validées par des approches de tumorigenèse *in vivo*.

## **Sphingosine kinase-1 promotes melanoma progression by inducing stromagenesis**

Virginie Albinet <sup>1,2,§</sup>, Marie-Lise Bats <sup>1,2,§</sup>, Andrea Huwiler <sup>3</sup>, Philippe Rochaix <sup>4</sup>,  
Christine Chevreau <sup>5</sup>, Bruno Ségui <sup>1,2</sup>, Thierry Levade <sup>1,2,6</sup> and Nathalie Andrieu-  
Abadie <sup>1,2 \*</sup>

<sup>1</sup>Inserm UMR1037, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, France,

<sup>2</sup>Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France, <sup>3</sup>Institute of Pharmacology,  
University of Bern, Bern, Switzerland, <sup>4</sup>Service d'anatomie et cytologie pathologiques,

<sup>5</sup>Département d'oncologie médicale, Institut Claudius Regaud, Toulouse, France,

<sup>6</sup>Laboratoire de Biochimie Métabolique, CHU Toulouse, France

**\*Corresponding author:** Nathalie Andrieu-Abadie, PhD; Inserm UMR1037 - Centre  
de Recherches en Cancérologie de Toulouse, CHU Rangueil BP84225, 31432  
Toulouse cedex 4 France. Phone: (33) 561.32.35.31; Fax: (33) 561.32.20.84; e-mail:  
nathalie.andrieu@inserm.fr

§ These authors contributed equally to this work

**Keywords:** fibroblasts, melanoma, metastasis, sphingosine-1-phosphate, *Sphk1*<sup>-/-</sup>  
mice

**Running title:** SPHK1 stimulates stromagenesis and melanoma progression

**Abstract**

Despite progress in the understanding of the biology and genetics of melanoma, no effective treatment against this cancer is available. The adjacent microenvironment plays a key role in the progression of these tumors. Defining the molecular signals that control the bidirectional dialogue between malignant cells and the surrounding stroma is crucial for efficient targeted therapy. Our study aimed at defining the role of sphingosine-1-phosphate (S1P) in melanoma-stroma interactions. Transcriptomic analysis of human melanoma cell lines showed increased expression of sphingosine kinase-1 (SPHK1), the enzyme that produces S1P, as compared to normal melanocytes. Such an increase was also observed by immunohistochemistry in melanoma specimens as compared to nevi, and occurred downstream of ERK activation due to BRAF or NRAS mutations. Importantly, migration of melanoma cells was not affected by changes in SPHK1 in melanoma but was stimulated by comparable modifications of S1P-metabolizing enzymes in co-cultured dermal fibroblasts. Reciprocally, incubation of fibroblasts with the conditioned medium from SPHK1-expressing melanoma cells resulted in their differentiation to myofibroblasts, increased production of matrix metalloproteinases, and enhanced SPHK1 expression and activity. *In vivo* tumorigenesis experiments showed that the lack of S1P in the microenvironment prevented the development of orthotopically injected melanoma cells. Finally, local tumor growth and metastases were enhanced more efficiently by co-injection of wild-type skin fibroblasts than by fibroblasts from *Sphk1*<sup>-/-</sup> mice. Altogether, our findings highlight the implication of SPHK1/S1P in stromagenesis to facilitate melanoma progression and metastases. This novel role of S1P in melanoma-microenvironment interactions makes this pathway a particularly attractive therapeutic target.

## Introduction

Tumors are composed of neoplastic cells and non-neoplastic stromal cells that interact with each other, either through direct heterotypic cell-cell contacts or through secreted diffusible molecules, to stimulate tumor progression towards an aggressive phenotype (1). One of the key cellular components in the microsystem of the reactive stroma is the myofibroblast, a modulated fibroblast that has acquired during stromagenesis the ability to express  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and to secrete growth factors, extracellular matrix (ECM) components including collagen and fibronectin and ECM modulating factors such as matrix metalloproteinases (MMPs) (2,3). These microenvironmental factors strongly contribute to enhance cancer cell growth but also promote their metastatic spread towards secondary organs, a key feature of tumor progression (4). Myofibroblasts derive from resident stromal cells or circulating mesenchymal stem cells, that have been attracted to the primary tumor site. Whatever their origin, under the influence of efferent signals from tumor cells, these cells differentiate into myofibroblasts, thereby engaging a cycle of paracrine afferent signals, sensed by cancer cells which respond by changing their motility and aggressiveness (5).

In melanoma, which is the most malignant and the deadliest form of all skin cancers (6), the dense and fibrotic nature of the tumor is thought to be a direct consequence of the presence of myofibroblasts (7). The recruitment and infiltration of large numbers of mesenchymal cells in the microenvironment of solid tumors is often associated with the development of high-grade cancers with poor prognosis (8). Notably, the determination of melanoma virulence, assessed either by Clark levels (9) or by the Breslow measurement of tumor thickness (10), has been conventionally related to the invasion of the dermal fibroblast-rich layer of the skin. However,

whereas the role of tumor-myfibroblast interactions in melanoma progression are increasingly documented (11), how dermal fibroblasts modulate this dialogue is less known. Recently, by using a 3D-coculture model in which preformed melanoma spheroids were implanted into a collagen matrix containing dermal fibroblasts, it has been shown that melanoma cells actively recruit normal fibroblasts (12). This event could contribute to melanoma cell growth and resistance to treatment but the molecular mechanisms underlying these processes have not yet been completely elucidated.

By transcriptomic analysis performed on various human skin melanoma cells, we previously observed that expression of sphingosine-1-phosphate (S1P) lyase, the enzyme that cleaves S1P, was reduced in tumor cells compared to normal melanocytes, suggesting that melanoma cells could accumulate S1P (13). This bioactive sphingolipid metabolite, which is mainly produced by sphingosine kinase-1 (SPHK1) in numerous cancer cells, conveys oncogenic signals as an intracellular second messenger and/or through a family of G-protein coupled receptors (S1PR1-5) expressed on tumor cells themselves as well as their surrounding microenvironment (14,15). Indeed, many lines of evidence point to the role of S1P in tumor angiogenesis by stimulating production of angiogenic factors and chemotaxis of endothelial cells, consequently, promoting tumor cell invasion and metastasis (16). Treatment of mice with FTY720, an antagonist of S1PRs, reduced melanoma progression by inhibiting tumor vascularization (17). Moreover, S1P-neutralizing antibodies blocked endothelial cell migration, capillary morphogenesis, and reduced tumor growth in murine xenograft and allograft models (18), indicating that S1P and its receptors are closely related to the angiogenic process.

Emerging evidence highlights the role of S1P-mediated signaling pathways in

promoting the transdifferentiation of fibroblasts into myofibroblasts during human fibrotic diseases (19). Interestingly, previous studies demonstrated that stromal myofibroblasts within the tumour resemble those present in wounded and fibrotic tissues, expressing a set of proteins including  $\alpha$ -SMA and others, allowing to grossly change the ECM architecture (20). However, whether S1P signaling is involved in the tumor invasion-promoting effect of myofibroblasts has never been studied.

Therefore, the goal of this study was to define the molecular mechanisms involved in the production of S1P in melanoma cells and to determine its effects on the communication between cancer cells and dermal fibroblasts. Our results identify the SPHK1/S1P as a critical signaling pathway in this dialogue to mediate melanoma cell invasion and metastasis.

## **Material and Methods**

### **Cell culture**

Melanoma, HEK293T cell lines and PSC-200-012 primary neonatal epidermal melanocytes were obtained from ATCC. Cells were thawed and passaged according to ATCC guidelines for less than 6 months after receipt or resuscitation. ATCC authenticates cell lines by DNA fingerprinting by STR analysis. Adult NHEM-M2 and juvenile NHEM-B primary melanocytes were from Lonza (Amboise, France). Melan-a murine melanocytes were from Dr. D. Bennett (London, UK). Fibroblasts were isolated from the dermis of healthy patients (Lab. Biochimie, CHU Toulouse). The MM455 cell line was kindly provided by Dr. H. Tsao (Boston, MA). Cells were grown as monolayers either in RPMI or DMEM media supplemented with 10% heat-inactivated FCS (PAA, Cergy-Pontoise, France) in the presence of 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere at 37°C.

### **Isolation of murine dermal fibroblasts**

Murine dermal fibroblasts were isolated as adapted from (21).

### **Cell transfection**

Transient transfections of HEK293T cells with BRAF or BRAFV600E-encoding plasmid were achieved using JetPEI reagent (Polyplus). pcDNA3.1-SPHK1 or SPHK1G82D plasmid was transfected into COLO829 and Melan-a cells and stable transfectants were selected for their resistance to 750µg/ml G418.

Transient RNA interference was achieved by using a pool of four small interfering RNAs (siRNA) specific for SPHK1, SGPL1 or BRAF (ON-TARGETplus SMARTpool;



Dharmacon) or scrambled siRNA. Cells were transfected using HiPerfect Reagent (Qiagen) and inhibition efficiency was evaluated 48h after transfection.

### **Migration assays**

Transmembrane cell migration assays were performed using FluoroBlok inserts (BD Biosciences, Bedford, MA). Fibroblasts were first seeded in the lower chamber and incubated in serum-free DMEM for 24h. Alternatively, the chamber contained S1P (Matreya, Pleasant Gap, PA) and/or VPC23019 (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL). A375-GFP cells ( $1.10^5$  cells) suspended in serum-free DMEM were then added into the upper chamber. After 24h of incubation, migration was determined by quantifying the fluorescence of cells that migrated to the underside of the insert membranes. In some assays, melanoma cell migration was assessed by scratch wound assay (12).

### **Quantitative RT-PCR**

Analyses of mRNA expression were achieved as described (13).

### **SPHK1 enzymatic assay**

SPHK1 activity was determined as described (22) with minor modifications.

### **S1P secretion**

Cells cultured in six-well plates were incubated for 10min with D-erythro-[3- $^3\text{H}$ ]sphingosine ( $1.5\mu\text{M}$ ,  $0.45\mu\text{Ci}$ ; Perkin-Elmer). The radiolabelled S1P released into the medium was quantified as described (23).

### **Western blot analyses**

Equal amounts of proteins were separated in a 10-15% SDS polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA). Protein complexes were detected using an ECL detection system (Pierce). Polyclonal anti-SPHK1, BRAF, Vimentin, ppERK, ERK and  $\beta$ -actin were purchased from Cell Signaling, anti-SGPL1 and  $\alpha$ -SMA antibodies from Sigma, and anti-MMPs, S1PR1 and S1PR3 antibodies from Epitomics.

### **Tumor allografts in mice**

Animal experiments were conducted in accordance with the 86/609/EC European directive, and our protocol was approved by the Regional Ethics Committee of Midi-Pyrénées. B16F10 cells ( $3 \cdot 10^5$ ) alone or B16F10 ( $1 \cdot 10^5$ ) mixed with fibroblasts ( $2 \cdot 10^5$ ) were injected intradermally into the flank of 8-week old C57BL/6 female mice (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) or *Sphk1*<sup>-/-</sup> mice (24). Tumor volumes were measured as described (25). Tumors were removed 19 days post-injection and weighed.

### **Immunohistochemical analysis**

Tissue specimens obtained from Institut Claudius Regaud were processed as reported (26). The primary rabbit anti-SPHK1 antibody (Sigma) was incubated for 1h at room temperature and revealed using a one-step peroxidase-conjugated polymer system (En Vision™ DAKO, Glostrup, Denmark) and 3,3'-diaminobenzidine. Scores for percentage of positive cells and scores for expression intensities were multiplied to calculate an immunoreactive score (IRS).

**Statistical analyses**

Results are expressed as means $\pm$ sem. Student's *t* test was used for statistical comparisons among groups and differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$  (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

## Results

### Dysregulation of S1P metabolism in melanomas

As we previously reported, the expression of S1P lyase, which irreversibly degrades S1P, was downregulated in a series of invasive or metastatic melanoma cells as compared with that of healthy melanocytes (13), we wondered whether expression of SPHK1, the kinase that produces S1P, is also altered in melanocytic tumor cells. Here, we report that, whereas SPHK2 and S1P phosphatase-1 (SGPP1) transcript levels were unchanged and decreased, respectively (Fig.S1), mRNA (Fig.1A) and protein (Fig.2A) levels of SPHK1 are upregulated in various human cutaneous melanoma cells. An increase of 1.7-11.5 fold of SPHK1 enzyme activity was observed in all human melanoma cell lines tested (Fig.1B) except for COLO829 cells in which the protein is virtually not expressed (Fig.1A and 2A). Similar results were observed for B16F10 murine melanoma cells as compared to murine melanocytes of C57BL/6 origin (Fig.1B). Moreover, immunohistochemical examination of biopsies obtained from a series of 30 patients with melanoma revealed a higher expression of SPHK1 in the tumor tissue than the adjacent melanocytic nevus (Fig.1C). Moreover, SPHK1 was expressed in the four main histologic subtypes of cutaneous melanoma (Fig.1D). Altogether, these findings show that S1P metabolism is altered in melanoma cells, pointing to a possible role of S1P in melanocytic tumor progression.

**SPHK1 expression and activity are modulated by the serine/threonine-specific protein kinase BRAF in melanoma cells**

With the discovery of frequent BRAF or NRAS mutations in melanocytic neoplasms, which result, for the vast majority of them, in a single amino acid change at codon 600 (BRAFFV600E) or 61 (NRASQ61L), respectively, activation of the RAS/RAF/MEK/ERK signaling pathway has emerged as a major event of the metastatic progression of melanoma (27).

As shown in Fig.2A, SPHK1 is overexpressed in melanoma cells in which BRAF and ERK are stimulated by the presence of activating NRAS or BRAF mutations. To determine the molecular mechanisms by which SPHK1 is activated, we first transfected HEK293T cells with a vector expressing either wild-type BRAF or oncogenic BRAFFV600E and then analyzed the effect on the expression and enzyme activity of SPHK1. As compared to the empty-vector control counterparts, BRAF overexpression was associated with increased ERK phosphorylation as well as SPHK1 expression and activity (Fig.2B and 2C). Interestingly, treatment of BRAF-overexpressing cells with the MEK inhibitor PD98059 decreased ERK phosphorylation and SPHK1 expression; similar findings were observed in BRAF siRNA-treated melanoma cells (Fig.2D). In contrast, SPHK1 overexpression in HEK293T cells or in melanocytes (Melan-a) or, conversely, silencing of the kinase in melanoma cells weakly affected ERK phosphorylation. The same results were obtained in melanocytes overexpressing the inactive mutant SPHK1G82D (Fig.2E). These results suggest that SPHK1 expression/activity is controlled by the RAS/RAF/ERK cascade in melanoma cells.

**Melanoma cell migration is not affected by tumor cell SPHK1 but is stimulated by SPHK1-expressing dermal fibroblasts.**

To investigate whether and how SPHK1 affects melanoma progression, we used the melanoma cell line COLO829 which was devoid of SPHK1 protein and we generated the COLO829(SPHK1) variant, which exhibited a high SPHK1 activity (Fig.3A). Then, we assessed the effects of SPHK1 on cell proliferation and migration. As illustrated in Fig.S2, no difference in cell number was observed upon SPHK1 overexpression. Migration of COLO829 cells also remained unaffected by ectopic SPHK1 (Fig.3B). These results were confirmed by using other melanoma cell lines in which SPHK1 was silenced, demonstrating that expression of SPHK1 alone within melanoma cells is not sufficient to stimulate their proliferation or migration.

Since fibroblasts strongly contribute to melanoma progression (28), we next examined the role of dermal fibroblasts on melanoma cell migration. To this end, A375 melanoma cells were seeded in Boyden chambers and co-cultivated for 24h with primary fibroblasts isolated from the dermis of healthy donors. Fig.3C shows that melanoma cell migration increased almost 4-times when tumor cells were cocultured with dermal fibroblasts. Interestingly, this phenomenon was further enhanced when SPHK1 was overexpressed by fibroblasts. Moreover, when A375 cells were cocultured with fibroblasts in which S1P lyase has been knocked-down (to promote S1P accumulation), tumor cell migration increased. In contrast, siRNA-mediated knockdown of SPHK1 in dermal fibroblasts led to ~50% decrease in melanoma cell migration. In accordance, the coculture of A375 cells with SPHK1-deficient fibroblasts, derived from the skin of *Sphk1*<sup>-/-</sup> mice, decreased their migration as compared to a coculture with wild-type fibroblasts. Altogether, these findings demonstrate that SPHK1 expressed by dermal fibroblasts stimulates melanoma cell migration and suggest (as indicated by the use of S1P lyase siRNA) that S1P itself could influence these interactions.

Finally, to determine the effect of S1P on melanoma cell migration, transwell migration assays were conducted on A375 melanoma cells treated with S1P. As depicted in Fig.3D, tumor cell migration was enhanced by 6-fold as compared with controls, respectively. Treatment by a pharmacological antagonist of S1PR1 and S1PR3 receptors abrogated this migratory effect.

### **SPHK1-expressing melanoma cells stimulate transition of fibroblasts to myofibroblasts : effect on melanoma cell migration**

To gain further insight into the communication between melanoma cells and dermal fibroblasts, we examined SPHK1 expression in dermal fibroblasts upon incubation with the conditioned medium either from COLO829(SPHK1) or control COLO829 which do not express SPHK1. As illustrated in Fig.4A and B, conditioned medium from COLO829(SPHK1) led to increased SPHK1 mRNA and protein levels in the fibroblasts ; however, no effect was observed on the expression of S1PR1 and 3. In addition, secretion of S1P by COLO829(SPHK1)-treated fibroblasts was greater than that by fibroblasts incubated with conditioned medium from control COLO829, and was comparable to that by SPHK1-overexpressing fibroblasts (Fig.4C).

As S1P can stimulate the transdifferentiation of fibroblasts into myofibroblasts during fibrotic diseases (19), we next explored the expression of  $\alpha$ -SMA, a common marker of myofibroblasts (29). Fig.4D shows that  $\alpha$ -SMA expression was strongly induced in dermal fibroblasts exposed to the conditioned medium from COLO829(SPHK1) as compared to untreated or control COLO829-stimulated fibroblasts. In contrast, none of the conditioned media altered the level of vimentin, a cytoskeletal protein expressed by mesenchymal cells.

In addition, levels of MMP-2 and -9 expression, but not MMP-1 and -13, four MMPs which are activated during melanoma cell invasion (30), were elevated in dermal fibroblasts upon incubation with conditioned medium from COLO829(SPHK1) (Fig.4D). Increased secretion of both MMPs was also observed in the medium of COLO829(SPHK1)-stimulated fibroblasts (Fig.4E).

To establish whether the above alterations seen in cultured fibroblasts also occur within melanocytic tumors, tumor-associated fibroblasts (TAFs) were isolated from human melanoma biopsies and characterized by their cytoskeleton marker  $\alpha$ -SMA. Unlike melanoma cells, TAFs expressed  $\alpha$ -SMA (Fig.S3A). In these cells, the mRNA levels of MMP-2, MMP-9 and SPHK1 as well as SPHK1 enzymatic activity were significantly increased as compared to human dermal fibroblasts (Fig.S3B).

Overall, these data indicate that modulation of SPHK1 within melanoma cells promotes tumor cell migration by regulating myofibroblast-like differentiation of dermal fibroblasts, SPHK1 activation and secretion of S1P by differentiated fibroblasts.

### **SPHK1 activity of dermal fibroblasts modulates tumor growth and dissemination in a mouse model of melanoma**

To determine the effect of SPHK1 suppression in dermal fibroblasts on melanoma growth and metastasis, B16F10 murine melanoma cells were injected intradermally into the flank of wild-type or SPHK1-knockout mice, and tumor volumes were monitored. As shown in Fig.5A, when orthotopically injected into *Sphk1*<sup>-/-</sup> syngenic mice, B16F10 tumors exhibited a dramatically decreased growth rate compared with tumors allografted in wild-type animals.



To further assess the contribution of SPHK1 originating from dermal fibroblasts, we mixed fibroblasts extracted from the skin of wild-type or *Sphk1*<sup>-/-</sup> mice with B16F10 melanoma cells in a 2:1 ratio, and inoculated these mixtures intradermally in syngenic wild-type C57BL/6 mice. As expected, B16F10 melanoma cells mixed with wild-type fibroblasts generated tumors of greater volume (Fig.5B) and weight (Fig.5C) than did B16F10 alone or murine melanoma cells that had been mixed with *Sphk1*<sup>-/-</sup> fibroblasts prior to injection into host animals. Importantly, injections of fibroblasts without melanoma cells did not induce any tumors (Fig.5B). In accordance, *Sphk1*<sup>-/-</sup> mice showed an increased tumor weight after co-implantation of B16F10 murine melanoma cells along with wild-type fibroblasts as compared to deficient mice injected with B16F10 alone or mixed with SPHK1-deficient fibroblasts (Fig.5C).

As SPHK1-expressing fibroblasts are able to stimulate the migration of melanoma cells in culture (Fig.3D), we next evaluated the impact of genetic deletion of SPHK1 in fibroblasts on the metastatic potential of the melanoma tumors. We found that 15-20% of the wild-type mice implanted with B16F10 mixed with wild-type fibroblasts developed lung metastases whereas only 2.5% of mice injected with B16F10 along with *Sphk1*<sup>-/-</sup> fibroblasts had metastases. In contrast, no metastasis was observed within 20 days in mice implanted with B16F10 alone (Fig.5D). Moreover, the number of metastases was 4-times higher in mice implanted with B16F10 mixed with wild-type fibroblasts compared to animals co-injected with SPHK1-deficient fibroblasts (data not shown). Overall, these results suggest that dermal fibroblasts regulate metastatic spread of melanoma cells and that SPHK1 expressed in fibroblasts is a major player in this process.

## Discussion

Mesenchymal modifications, also known as stromagenesis, are a common feature of many solid tumors (29). In melanoma, stromagenesis corresponds to a four-stage process similar to that described during wound healing or fibrosis, that involves : i) recruitment of resident dermal fibroblasts or circulating precursor cells ; ii) fibroblast activation and proliferation ; iii) transdifferentiation into myofibroblasts; and iv) synthesis and secretion of mediators that promote tumor cell growth and propagation (28). These stromal alterations, triggered by cancer cells themselves during early tumor development, constitute a key step of tumorigenesis. Defining intercellular molecular dialogues in melanoma, a highly aggressive tumor, has become a major challenge to identify potential stroma targets that could slow down the formation of secondary tumor foci.

Here, we report that S1P metabolism plays a pivotal role in this communication. It is altered in melanoma cells as illustrated by down-regulation of the S1P-degrading enzymes, S1P lyase (13) and phosphatase, and conversely, up-regulation of the S1P-producing enzyme SPHK1, with no significant modification of the apoptosis-inducing kinase SPHK2. SPHK1 expression was increased in cancer versus non-cancer tissue in cutaneous melanoma patients but this activation is not associated with a particular histologic subtype while NRAS or BRAF mutations are frequent in nodular and superficial spreading melanoma (31). We also show that expression of SPHK1 depends on ERK phosphorylation, downstream of BRAF which is constitutively activated in melanoma due to the presence of activating NRAS or BRAF mutations. These data agree with studies showing that in many tumors SPHK1 mRNA and protein expression are enhanced relative to healthy tissue (32). Moreover, they corroborate the finding that V12-H-Ras, an active mutant of Ras, was

able to activate SPHK1 in 3T3 fibroblasts (33). However, this is the first report which demonstrates that SPHK1 expression is dependent on the RAS/RAF/MEK/ERK signaling pathway, either in NRAS- or BRAF-mutated melanoma cells, suggesting that SPHK1 could be a novel molecular target for anti-melanoma therapies. A recent study reported that targeting SPHK1 by genetic or pharmacological approaches increases apoptosis of xenografted melanoma tumors (34). This protective effect correlated with decreased Bcl-2 expression (35).

In addition, this study demonstrates that endogenous production of S1P by SPHK1 alters neither proliferation nor migration of melanoma cells. In contrast, tumor cell migration was significantly enhanced in the presence of dermal fibroblasts especially when they express SPHK1. These results reinforce the concept that dermal fibroblasts are key players of melanoma development (12). Moreover, we observed that the migratory potential of human melanoma cells correlates with their ability to stimulate SPHK1 expression in dermal fibroblasts. The latter cells secrete S1P into the medium which in turn activates melanoma migration. This event was blocked by VPC23019, a S1PR1 and S1PR3 antagonist, suggesting that the migratory effect of S1P is mediated by either of these receptors. However, why expression SPHK1 in melanoma cells was not sufficient by itself to induce migration, remains to be clarified. One explanation may relate to S1PR expression levels. Indeed, a 3-fold increase in S1PR3, but not S1PR1 and 2 (data not shown), was observed in A375 cells cocultured with SPHK1-overexpressing fibroblasts compared to control fibroblasts. Of note, activation of S1PR3 receptors by S1P triggers migration of numerous cell types by regulating rho family small-G-proteins (14).

Moreover, we show that SPHK1-expressing melanoma cells can induce fibroblast differentiation into myofibroblasts. Expression of the two gelatinases MMP-

2 and -9, which contribute to matrix remodeling *in vivo*, was also induced upon treatment with the conditioned medium of SPHK1-expressing melanoma cells. Interestingly, increased expression of SPHK1, MMP-2 and -9 was also found in  $\alpha$ -SMA-expressing TAFs isolated from human melanoma biopsies.

These data emphasize a new role for SPHK1/S1P signaling in fibroblastic differentiation in the context of cancer (see Fig.S4). Indeed, emerging evidence shows that S1P production is linked to myofibroblastic differentiation during wound healing (36) or fibrotic lesions (19,37). For instance, S1P promotes differentiation of human lung fibroblasts to a pro-fibrotic, myofibroblast phenotype (38) and stimulates collagen synthesis in foreskin fibroblasts (39). In addition, S1P induces  $\alpha$ -SMA expression in hepatic (40) and lung fibroblasts (41). Many of these actions are mediated by the binding of S1P to its receptors. Nonetheless, in our experiments, direct stimulation of dermal fibroblasts with exogenous S1P did not replicate the effects obtained with conditioned media from SPHK1-expressing melanoma cells (data not shown). This suggests that the differentiating effects of SPHK1-expressing melanoma cells are not mediated solely by extracellular S1P. One could speculate that these cells secrete other factors that induce both SPHK1 activation in fibroblasts and differentiation into myofibroblasts. For instance, TGF- $\beta$ , a key cytokine of fibroblastic differentiation, can stimulate SPHK1 expression in dermal (42) and cardiac (43) fibroblasts.

Of major interest was the finding that S1P production by skin fibroblasts, present in the vicinity of tumor cells, enhanced *in vivo* melanoma growth and dissemination. Importantly, mice allografted with B16F10 murine melanoma cells exhibited substantial retardation of tumor progression upon anti-S1P antibody treatment (18). This event was associated to the inhibition of vascular endothelial cell migration and

bFGF- and VEGF-induced angiogenesis. In addition to the S1P's key paracrine role in blood-vessel formation (44,45), lymphangiogenesis (45,46) and inflammation-related carcinogenesis (47), our findings now provide evidence that SPHK1/S1P signaling could initiate stromagenesis, facilitate local tumor growth and promote metastasis in melanoma. Besides the very recently reported role of systemic S1P in regulating lung colonization of circulating tumor cells (48), our observation adds a novel facet to the functions of SPHK1/S1P in cancer. This gives further credence to therapeutic strategy targeting the SPHK1/S1P axis that would fight cancer through multiple actions.

**Disclosure of Potential Conflict of Interest**

No potential conflicts of interest were disclosed.

**Acknowledgments**

The authors thank Drs. D. Bennett (London, UK), R. Marais (London, UK), SM. Pitson (Adelaide, Australia) and H. Tsao (Boston, MA) for providing cells and vectors, and C. Fourreau and C. Nevoit for technical support. Financial support by INSERM, Paul Sabatier University and LNCC is gratefully acknowledged. V.A. is a recipient of a fellowship from ARC.

## References

1. De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* 2003;200:429-47.
2. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:392-401.
3. Cirri P, Chiarugi P. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 2011;31:195-208.
4. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009;9:239-52.
5. Kunz-Schughart LA, Knuechel R. Tumor-associated fibroblasts (part I): Active stromal participants in tumor development and progression? *Histol Histopathol* 2002;17:599-621.
6. Geller AC, Swetter SM, Brooks K, Demierre MF, Yaroch AL. Screening, early detection, and trends for melanoma: current status (2000-2006) and future directions. *J Am Acad Dermatol* 2007;57:555-72.
7. Ruiter D, Bogenrieder T, Elder D, Herlyn M. Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. *Lancet Oncol* 2002;3:35-43.
8. Shimoda M, Mellody KT, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin Cell Dev Biol* 2010;21:19-25.
9. Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry Dt, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1893-904.
10. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970;172:902-08.

11. Smalley KS, Lioni M, Herlyn M. Targeting the stromal fibroblasts: a novel approach to melanoma therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 2005;5:1069-78.
12. Flach EH, Rebecca VW, Herlyn M, Smalley KS, Anderson AR. Fibroblasts contribute to melanoma tumor growth and drug resistance. *Mol Pharm* 2011;8:2039-49.
13. Colie S, Van Veldhoven PP, Kedjouar B, Bedia C, Albinet V, Sorli SC et al. Disruption of sphingosine 1-phosphate lyase confers resistance to chemotherapy and promotes oncogenesis through Bcl-2/Bcl-xL upregulation. *Cancer Res* 2009;69:9346-53.
14. Huwiler A, Pfeilschifter J. New players on the center stage: sphingosine 1-phosphate and its receptors as drug targets. *Biochem Pharmacol* 2008;75:1893-900.
15. Maceyka M, Harikumar KB, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol* 2012;22:50-60.
16. Rolin J, Maghazachi AA. Effects of lysophospholipids on tumor microenvironment. *Cancer Microenviron* 2011;4:393-403.
17. LaMontagne K, Littlewood-Evans A, Schnell C, O'Reilly T, Wyder L, Sanchez T et al. Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization. *Cancer Res* 2006;66:221-31.
18. Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, Cavalli AL, Moreno KM, Matteo RG et al. Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell* 2006;9:225-38.



19. Takuwa Y, Ikeda H, Okamoto Y, Takuwa N, Yoshioka K. Sphingosine-1-phosphate as a mediator involved in development of fibrotic diseases. *Biochim Biophys Acta* 2012;in press.
20. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986;315:1650-9.
21. Sly WS, Grubb J. Isolation of fibroblasts from patients. *Methods Enzymol* 1979;58:444-50.
22. Lavieu G, Scarlatti F, Sala G, Carpentier S, Levade T, Ghidoni R et al. Sphingolipids in macroautophagy. *Methods Mol Biol* 2008;445:159-73.
23. Mitra P, Payne SG, Milstien S, Spiegel S. A rapid and sensitive method to measure secretion of sphingosine-1-phosphate. *Methods Enzymol* 2007;434:257-64.
24. Pushparaj PN, Manikandan J, Tay HK, H'Ng S C, Kumar SD, Pfeilschifter J et al. Sphingosine kinase 1 is pivotal for Fc epsilon RI-mediated mast cell signaling and functional responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 2009;183:221-7.
25. Vasseur S, Hoffmeister A, Garcia S, Bagnis C, Dagorn JC, Iovanna JL. p8 is critical for tumour development induced by rasV12 mutated protein and E1A oncogene. *EMBO Rep* 2002;3:165-70.
26. Asnacios A, Courbon F, Rochaix P, Bauvin E, Cances-Lauwers V, Susini C et al. Indium-111-pentetreotide scintigraphy and somatostatin receptor subtype 2 expression: new prognostic factors for malignant well-differentiated endocrine tumors. *J Clin Oncol* 2008;26:963-70.
27. Rebecca VW, Sondak VK, Smalley KS. A brief history of melanoma: from mummies to mutations. *Melanoma Res* 2012;22:114-22.

28. Li G, Satyamoorthy K, Meier F, Berking C, Bogenrieder T, Herlyn M. Function and regulation of melanoma-stromal fibroblast interactions: when seeds meet soil. *Oncogene* 2003;22:3162-71.
29. Beacham DA, Cukierman E. Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Semin Cancer Biol* 2005;15:329-41.
30. Hofmann UB, Houben R, Brocker EB, Becker JC. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie* 2005;87:307-14.
31. Platz A, Egyhazi S, Ringborg U, Hansson J. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol Oncol* 2008;1:395-405.
32. French KJ, Schrecengost RS, Lee BD, Zhuang Y, Smith SN, Eberly JL et al. Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Res* 2003;63:5962-9.
33. Xia P, Gamble JR, Wang L, Pitson SM, Moretti PA, Wattenberg BW et al. An oncogenic role of sphingosine kinase. *Curr Biol* 2000;10:1527-30.
34. Madhunapantula SV, Hengst J, Gowda R, Fox TE, Yun JK, Robertson GP. Targeting sphingosine kinase-1 to inhibit melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2012;25:259-74.
35. Bektas M, Jolly PS, Muller C, Eberle J, Spiegel S, Geilen CC. Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression. *Oncogene* 2005;24:178-87.
36. Watterson KR, Lanning DA, Diegelmann RF, Spiegel S. Regulation of fibroblast functions by lysophospholipid mediators: potential roles in wound healing. *Wound Repair Regen* 2007;15:607-16.

37. Pyne NJ, Dubois G, Pyne S. Role of sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid in fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 2012;in press.
38. Urata Y, Nishimura Y, Hirase T, Yokoyama M. Sphingosine 1-phosphate induces alpha-smooth muscle actin expression in lung fibroblasts via Rho-kinase. *Kobe J Med Sci* 2005;51:17-27.
39. Youm JK, Jo H, Hong JH, Shin DM, Kwon MJ, Jeong SK et al. K6PC-5, a sphingosine kinase activator, induces anti-aging effects in intrinsically aged skin through intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *J Dermatol Sci* 2008;51:89-102.
40. Li C, Zheng S, You H, Liu X, Lin M, Yang L et al. Sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptors are involved in human liver fibrosis by action on hepatic myofibroblasts motility. *J Hepatol* 2011;54:1205-13.
41. Keller CD, Rivera Gil P, Tolle M, van der Giet M, Chun J, Radeke HH et al. Immunomodulator FTY720 induces myofibroblast differentiation via the lysophospholipid receptor S1P3 and Smad3 signaling. *Am J Pathol* 2007;170:281-92.
42. Yamanaka M, Shegogue D, Pei H, Bu S, Bielawska A, Bielawski J et al. Sphingosine kinase 1 (SPHK1) is induced by transforming growth factor-beta and mediates TIMP-1 up-regulation. *J Biol Chem* 2004;279:53994-4001.
43. Gellings Lowe N, Swaney JS, Moreno KM, Sabbadini RA. Sphingosine-1-phosphate and sphingosine kinase are critical for transforming growth factor-beta-stimulated collagen production by cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 2009;82:303-12.
44. Milstien S, Spiegel S. Targeting sphingosine-1-phosphate: a novel avenue for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2006;9:148-50.

45. Nagahashi M, Ramachandran S, Kim EY, Allegood JC, Rashid OM, Yamada A et al. Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 1 promotes breast cancer progression by stimulating angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cancer Res* 2012;72:726-35.
46. Anelli V, Gault CR, Snider AJ, Obeid LM. Role of sphingosine kinase-1 in paracrine/transcellular angiogenesis and lymphangiogenesis in vitro. *Faseb J* 2010;24:2727-38.
47. Kawamori T, Kaneshiro T, Okumura M, Maalouf S, Uflacker A, Bielawski J et al. Role for sphingosine kinase 1 in colon carcinogenesis. *Faseb J* 2009;23:405-14.
48. Ponnusamy S, Selvam SP, Mehrotra S, Kawamori T, Snider AJ, Obeid LM et al. Communication between host organism and cancer cells is transduced by systemic sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signalling to regulate tumour metastasis. *EMBO Mol Med* 2012;in press.

## Legends to the figures

### Figure 1. Expression of SPHK1 in melanoma

**(A)** SPHK1 mRNA in human melanoma cell lines was quantified by RT-PCR. Data are expressed as fold-change over the levels in adult (NHEM-M2) or juvenile (NHEM-B) human melanocytes. Data are means $\pm$ sem of 3 independent experiments done in duplicate. **(B)** SPHK1 activity was measured in human (left) and mouse (right) melanoma cell lines. Data are expressed as fold-change over the activity in human (left) and murine (right) melanocytes. Results are representative of at least 2 independent experiments performed in duplicate. **(C)** SPHK1 expression was evaluated by immunohistochemistry in biopsies from patients. (Left) Representative picture of SPHK1 detection in melanoma (arrows) compared to an adjacent nevus. (Right) Immunoreactive scores (IRS) of SPHK1 expression in nevi (n=20) and melanoma (n=30). Horizontal lines correspond to the IRS means. **(D)** SPHK1 IRS in melanoma (n=26) according to subtype : superficial spreading (SSM), nodular (NM), acral lentiginous (ALM) and lentigo maligna (LMM) melanoma.

### Figure 2. Regulation of SPHK1 expression by BRAF

**(A)** Cell lysates (50  $\mu$ g protein) of human neonatal melanocytes (PSC-200-012) and melanoma cell lines were subjected to SDS-PAGE and Western blotted with anti-SPHK1, BRAF and ppERK. An anti- $\beta$ -actin was used as a control for protein loading. Results are representative of at least 2 independent experiments. The status for NRAS and BRAF mutations is indicated (nd, not determined). **(B)** HEK293T cells were transfected with an empty vector or with a plasmid encoding either for the wild-

type or oncogenic (V600E) form of BRAF. Expression of BRAF, ppERK, SPHK1 and S1P lyase was evaluated by Western blot. **(C)** SPHK1 activity was measured in the cells described in B. Data are means $\pm$ sem of 2 independent experiments done in duplicate. **(D)** Western blot analysis of BRAF, ppERK and SPHK1 in HEK293T cells expressing BRAF incubated or not for 24h with PD98059 (50  $\mu$ M) and in SKMel-28 cells transfected with a control (Ctrl) or BRAF siRNA (10 nM) for 72h. **(E)** Analysis of BRAF, ppERK and SPHK1 in HEK293T, Melan-a and WM-115 cells transfected with an empty vector, a plasmid coding for wild-type or mutated (G82D) form of SPHK1, or with control (Ctrl) or SPHK1 siRNA (20 nM) for 72h. Anti-ERK and anti- $\beta$ -actin antibodies were used as controls.

**Figure 3.** Melanoma cell migration is modulated by fibroblast-derived S1P

**(A)** COLO829 cells were transfected with an empty vector or with a plasmid coding for SPHK1. SPHK1 expression and activity were then evaluated by Western blot and enzymatic assay, respectively. Results are representative of at least 3 independent experiments. **(B)** Scratch wound assays were performed to evaluate migration of COLO829 cells transfected with an empty vector or a plasmid coding for SPHK1, or A375 and SKMel-28 cells transfected with control (Ctrl) or SPHK1 siRNA (20 nM). Silencing of SPHK1 in A375 cells by siRNA was estimated by Western blot. Data are means $\pm$ sem of 2-4 independent experiments. **(C)** Effects of modifications of S1P metabolism in fibroblasts on A375 melanoma cell migration were evaluated by transwell migration assays. To increase the production of S1P by fibroblasts, SPHK1 was overexpressed or S1P lyase (SGPL1) silenced in human fibroblasts using siRNA (left panels). Conversely, to reduce the production of S1P by fibroblasts, we used

either siRNA targeting SPHK1 or murine *Sphk1*<sup>-/-</sup> skin fibroblasts (right panels). Expression of SGPL1 and SPHK1 was estimated by Western blot. Data are expressed as fold-induction over migration observed in the absence of fibroblasts or with control fibroblasts, and are means of 2-9 independent experiments. **(D)** A375 melanoma cell migration was evaluated by transwell migration assays in the presence of exogenous S1P (5 $\mu$ M) or VPC23019 (2 $\mu$ M). Data are expressed as fold-induction $\pm$ sem over migration in serum-free medium, and are means of 2 independent experiments.

**Figure 4.** Expression of SPHK1 in melanoma cells makes fibroblasts secrete S1P, transdifferentiate and produce MMP

Human skin fibroblasts were incubated 24h with conditioned media either from control (vector) or SPHK1-overexpressing COLO829 melanoma cells. **(A)** Expression of SPHK1, S1PR1 and S1PR3 was then evaluated by RT-PCR. Data are expressed as fold-change over the levels in fibroblasts incubated with control conditioned medium, and represent means of 3 independent experiments. **(B)** Western blot analysis of SPHK1, S1PR1 and S1PR3. Data are representative of 3 independent experiments. **(C)** Secretion of S1P by fibroblasts incubated with conditioned media and by control or SPHK1-overexpressing fibroblasts was monitored after [<sup>3</sup>H]-sphingosine labelling. Data are means $\pm$ sem of 3 independent experiments. **(D)** Effects of incubation with conditioned media on the expression of  $\alpha$ -SMA, vimentin and MMPs, as evaluated by Western blot; an anti-ERK was used as control. **(E)** After 24h incubation with COLO829-conditioned media, the culture medium from fibroblasts was subjected to zymography to evaluate MMP-2 and -9 gelatinase

activity. Results are representative of at least 2 experiments.

**Figure 5.** SPHK1 expression in fibroblasts drives melanoma tumor development

**(A)** B16F10 murine melanoma cells ( $3 \cdot 10^5$ ) were injected in the dermis of wild-type (WT) (n=28) or *Sphk1*<sup>-/-</sup> (n=18) mice. **(B)** B16F10 cells ( $1 \cdot 10^5$ ) together with WT or *Sphk1*<sup>-/-</sup> dermal fibroblasts ( $2 \cdot 10^5$ ) were injected in the dermis of WT mice (n=17). Alternatively, WT or *Sphk1*<sup>-/-</sup> dermal fibroblasts alone ( $2 \cdot 10^5$ ) were injected as controls (n=3). **(C)** After excision, tumors were weighed. Data are expressed as fold-increase over simple injections (NS, not significant). **(D)** The percentage of WT mice having developed metastases was monitored for each group.





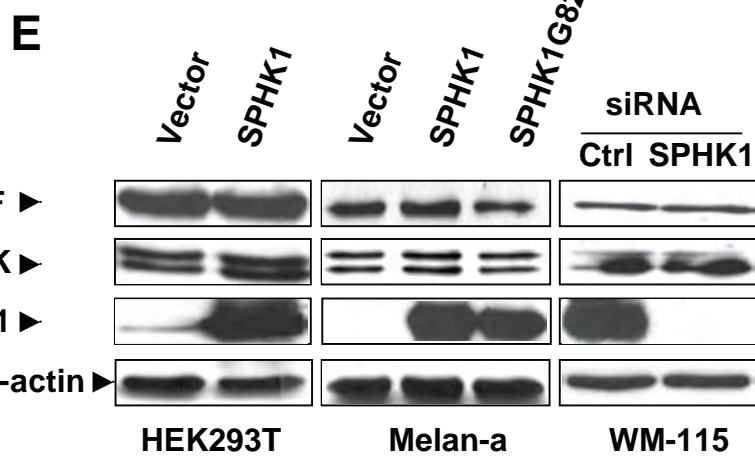
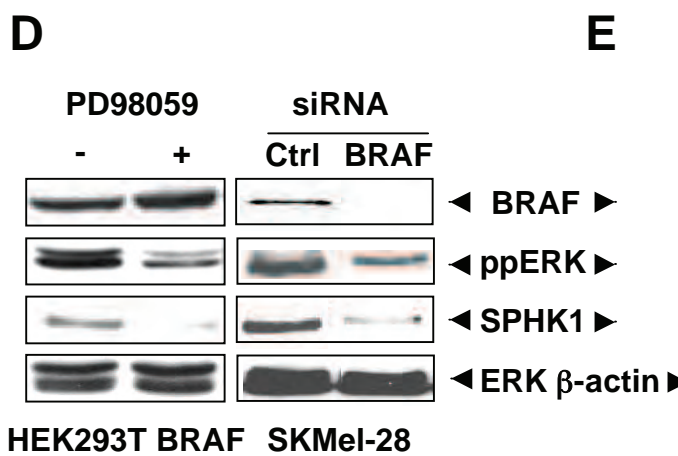
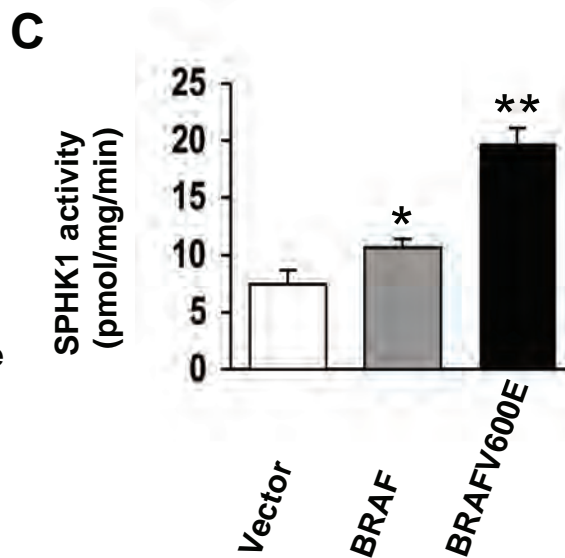
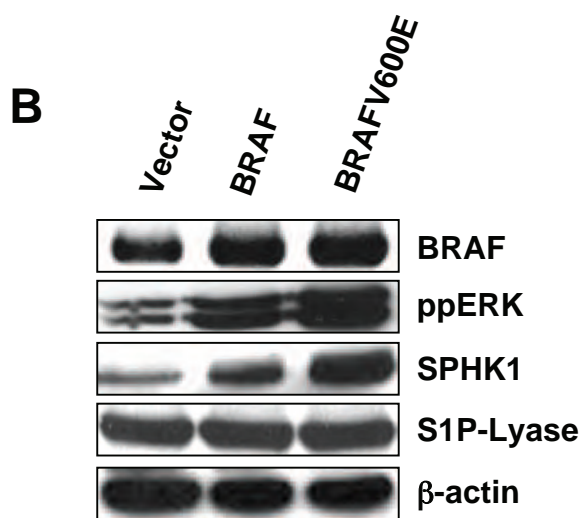
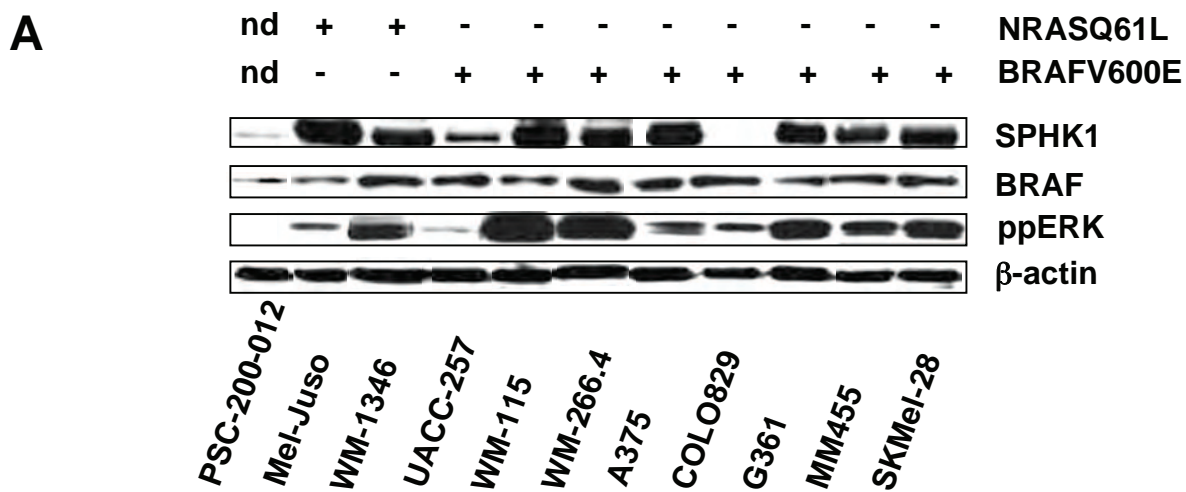


Figure 2 Albinet *et al.*

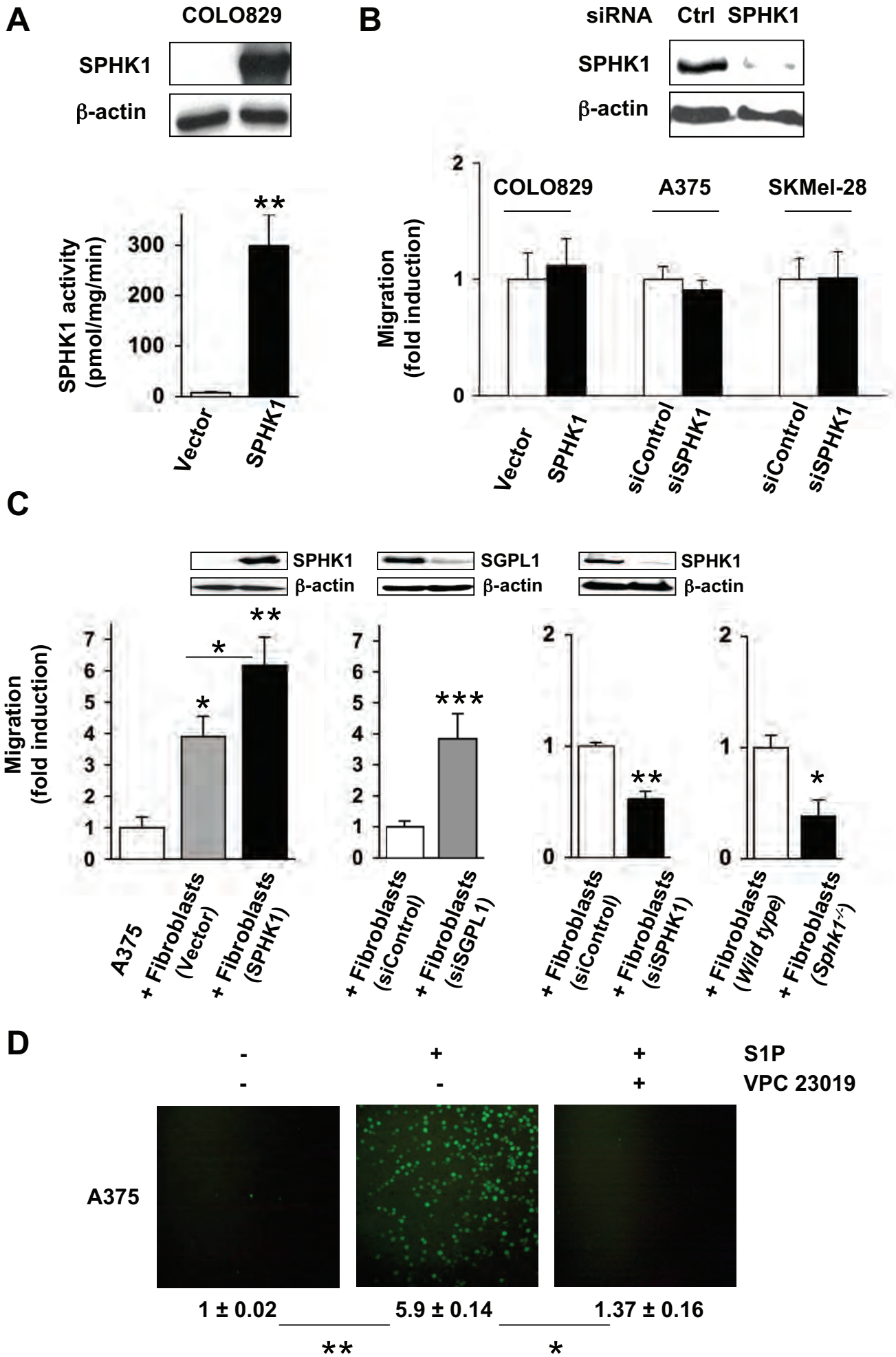


Figure 3 Albinet *et al.*

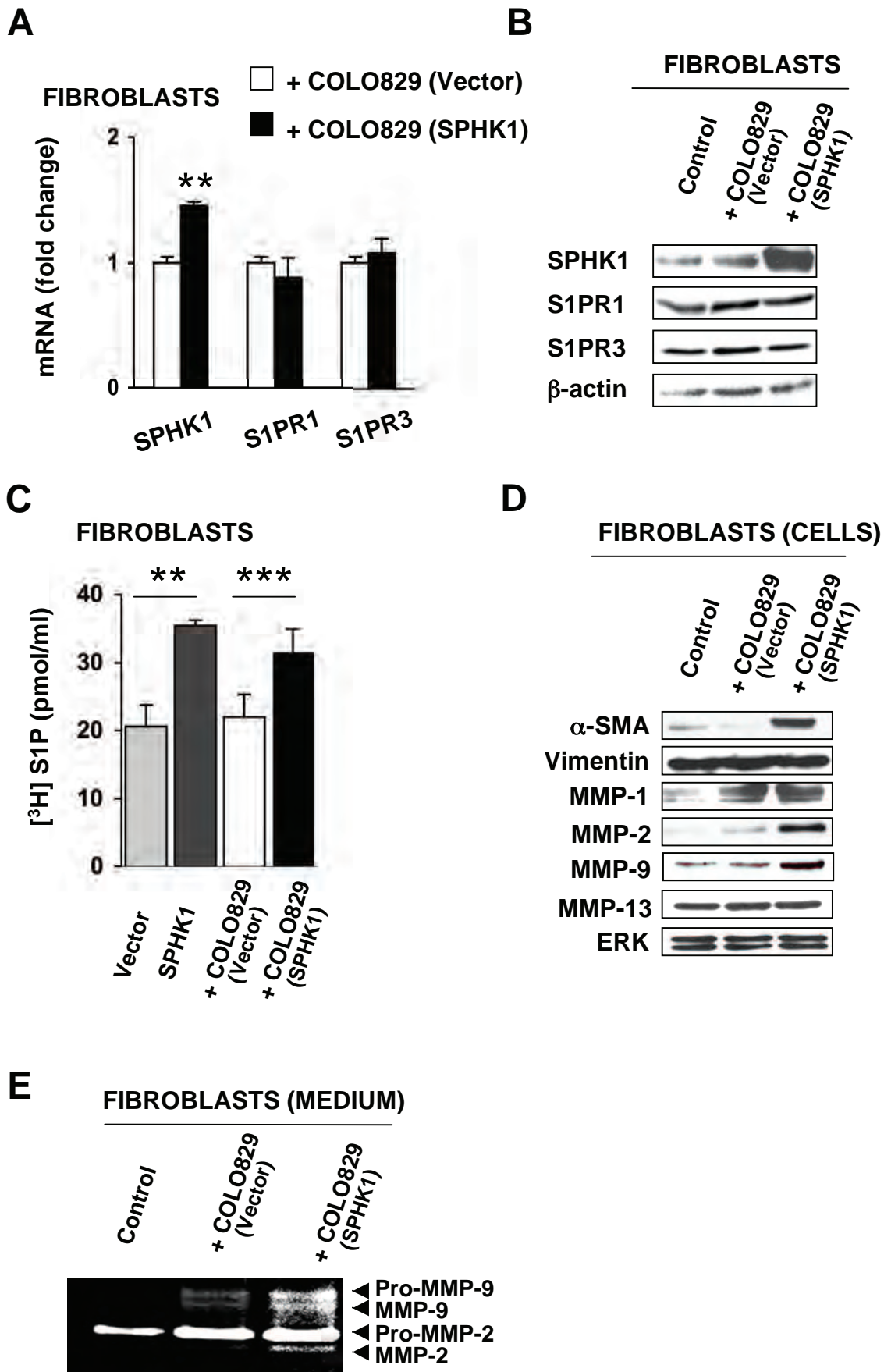
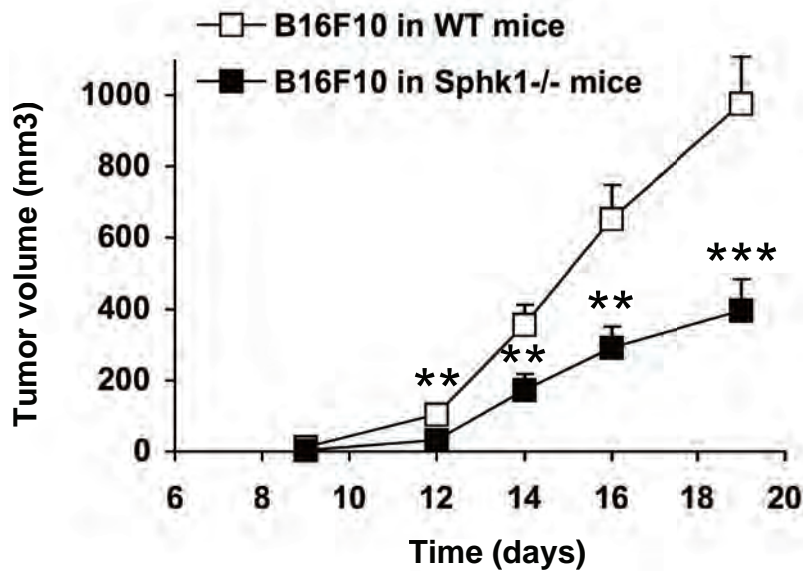
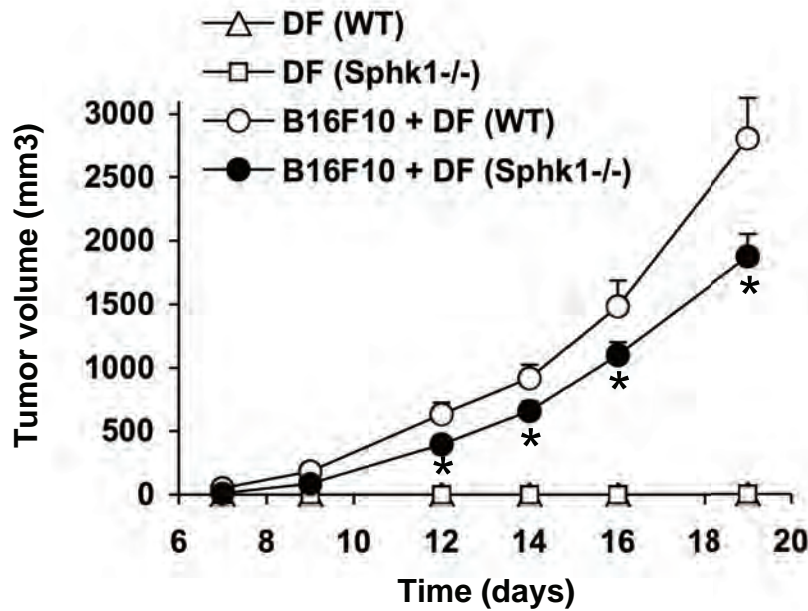


Figure 4 Albinet *et al.*

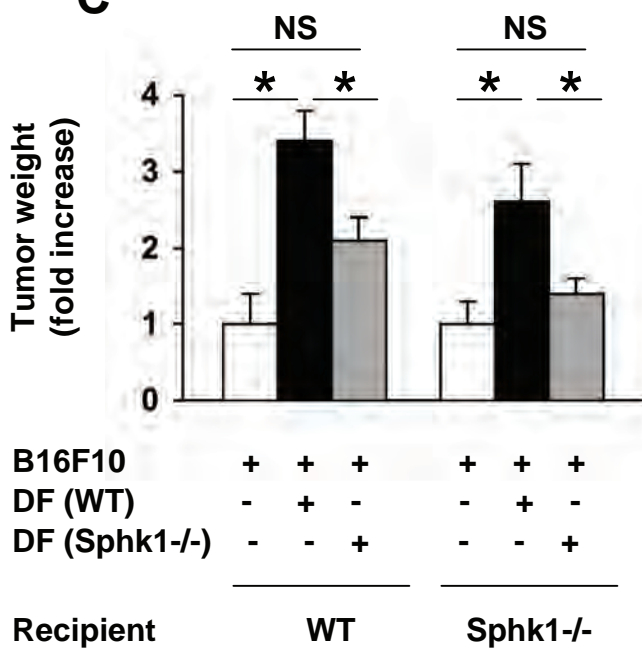
**A**



**B**



**C**



**D**

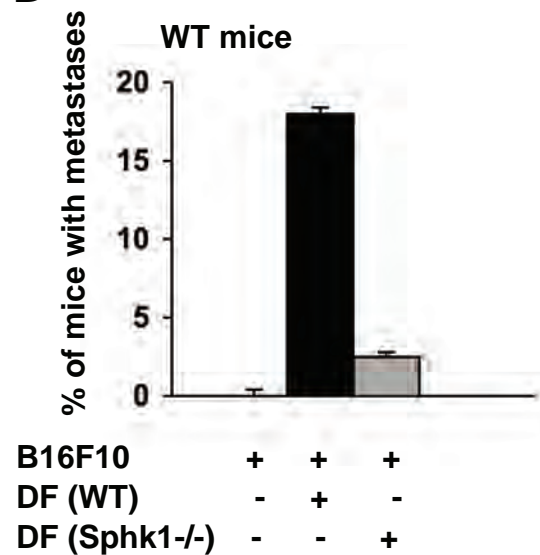


Figure 5 Albinet *et al.*

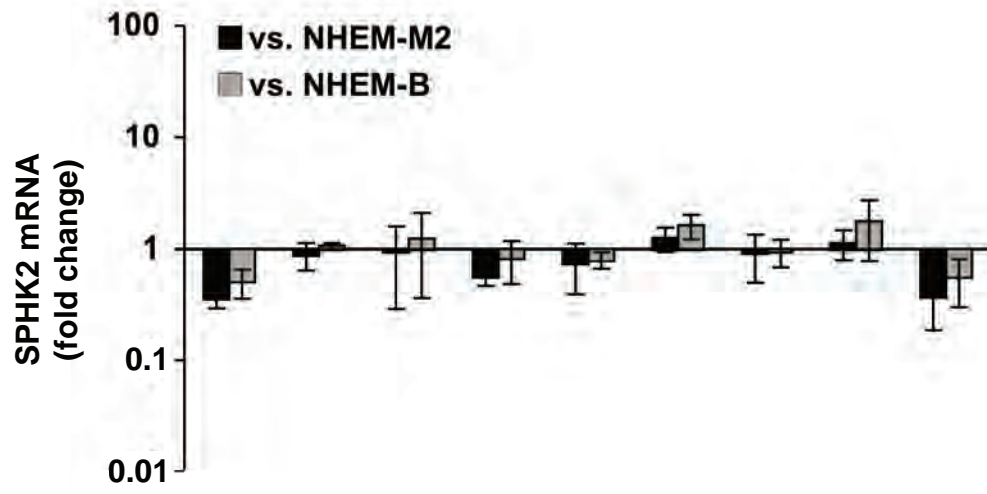
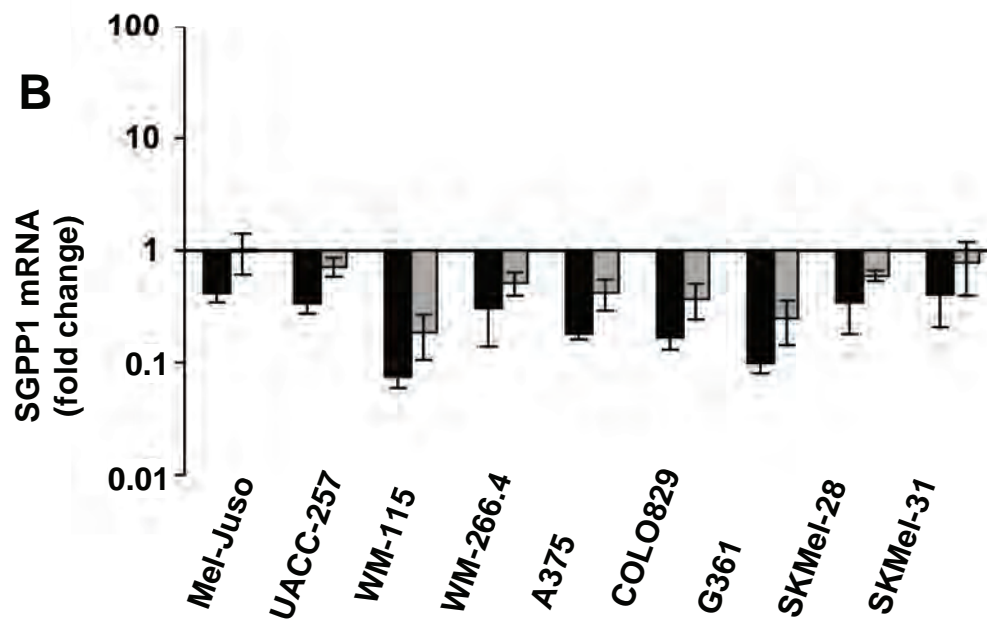
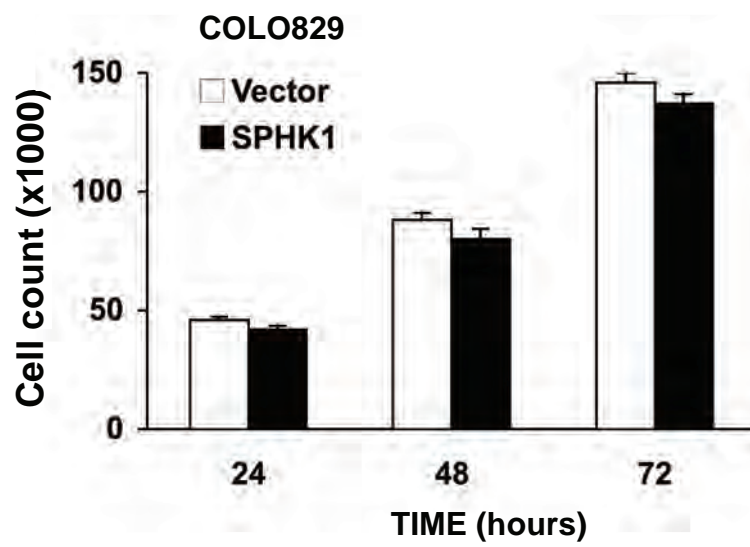
**A****B**

Figure S1 Albinet *et al.*



**Figure S2 Albinet *et al.***

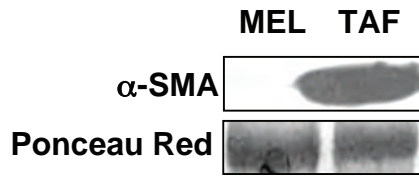
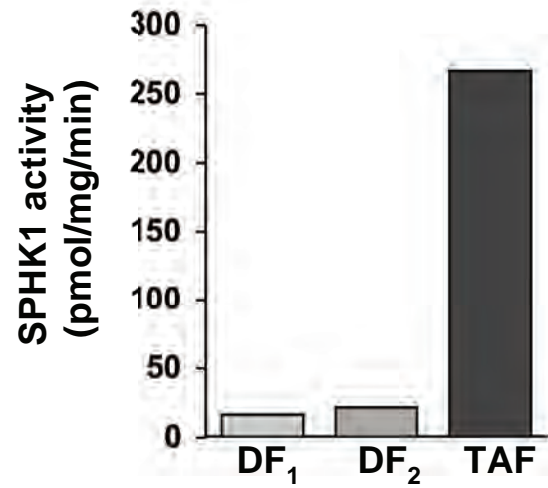
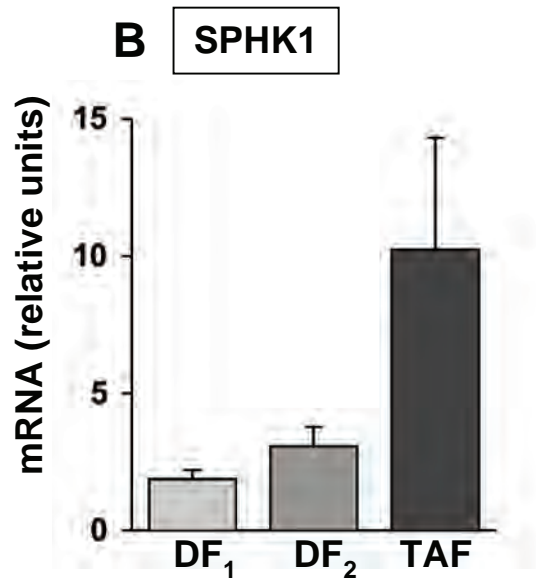
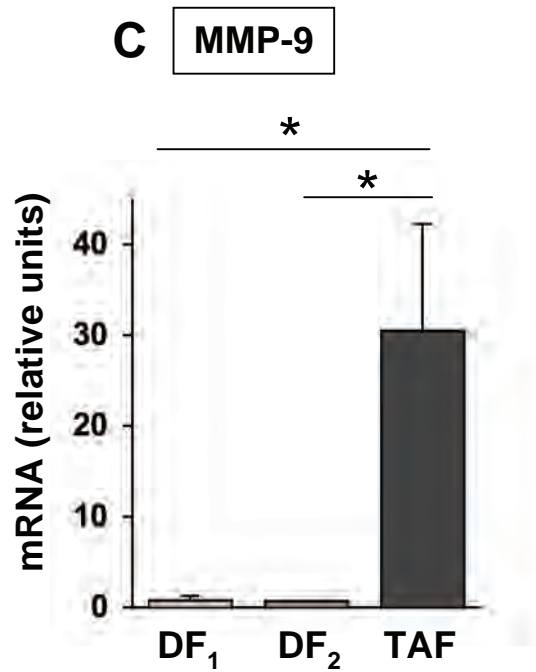
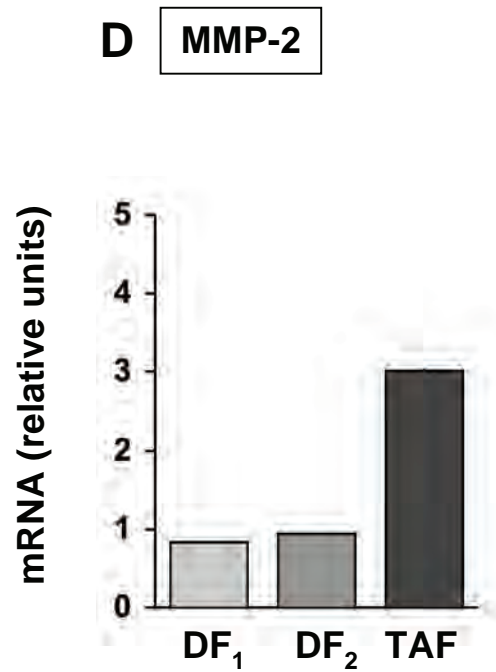
**A****B****C****D**

Figure S3 Albinet *et al.*



MELANOMA

FIBROBLAST

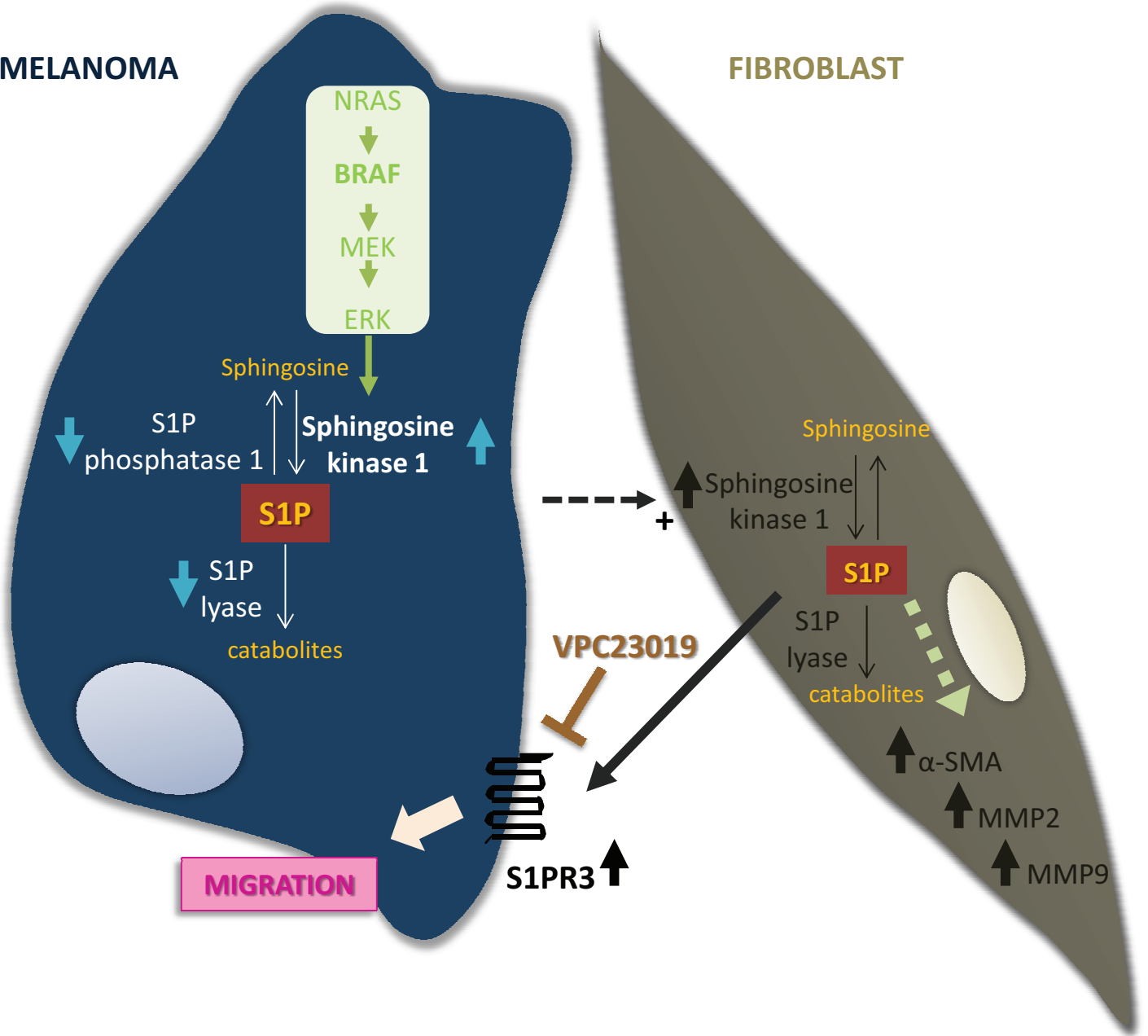


Figure S4 Albinet *et al.*

## **Supplemental Materials and Methods**

### **Proliferation assay**

Melanoma cells ( $4 \cdot 10^4$ ) were plated in 24-well plates in medium containing 1% of FCS and counted at the indicated time using a Beckman Coulter Z1 particle counter.

### **Isolation of tumor-associated fibroblasts (TAFs)**

Melanoma tissue samples were rinsed in cold PBS containing 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Samples were minced and subjected to overnight digestive dissociation using 0.2% collagenase at 37°C. The resultant mixture was centrifuged at 200 g for 4 min. Supernatants were passed through 100 µm cell strainer (BD Bioscience) before plating. The fibroblast-enriched fraction was cultured for up to 3 passages in DMEM containing 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine at 37°C using a humidified atmosphere and 5% CO<sub>2</sub>. Homogeneity was confirmed by direct microscopic observations, and TAFs were characterized for their expression of α-SMA.

## **Supplemental Figure Legends**

**Supplemental Figure S1.** Expression of SPHK2 and SGPP1 in melanoma cell lines

**(A)** SPHK2 and **(B)** SGPP1 mRNA in human melanoma cell lines were quantified by RT-PCR. Data are expressed as fold-change over the levels in adult (NHEM-M2) or juvenile (NHEM-B) normal human melanocytes. Data are means $\pm$ sem of 3 independent experiments done in duplicate.

**Supplemental Figure S2.** SPHK1 does not stimulate COLO829 melanoma cell proliferation

COLO829 cells were transfected either with an empty vector or a plasmid encoding for SPHK1, and grown for the indicated times in medium containing 1% of FCS. Data are expressed as cell counts and are means $\pm$ sem of 2 independent experiments.

**Supplemental Figure S3.** Phenotypic features of human tumor-associated fibroblasts

**(A)** Western blot analysis of  $\alpha$ -SMA expression in tumor-associated fibroblasts (TAF) as compared to A375 melanoma cells. **(B)** SPHK1 mRNA level (left) and enzymatic activity (right) of TAF as compared to those of normal dermal fibroblasts (DF) from two distinct subjects. **(C)** MMP-9 and **(D)** MMP-2 mRNA quantified by RT-PCR. Data are means $\pm$ sem of at least 2 independent experiments done in duplicate.

**Figure S4. Role of SPHK1/S1P in melanoma-fibroblast interactions**

As compared to normal melanocytes, SPHK1 is upregulated in melanoma cells whereas the enzymes responsible for S1P catabolism, S1P phosphatase and S1P

lyase, are downregulated. Expression of SPHK1 in melanoma is positively regulated by the NRAS/BRAF/MAPK pathway. Co-incubation with melanoma cells or their conditioned media leads to increased SPHK1 expression in dermal fibroblasts. This is associated with increased expression of fibroblast differentiation markers, such as  $\alpha$ -SMA, and MMP-2 and -9, and enhanced migration of melanoma cells. Manipulation of S1P metabolism in fibroblasts as well as antagonism of S1PR3 influenced melanoma cell migration melanoma. This affected the metastatic potential of melanoma cells when co-transplanted with dermal fibroblasts into syngenic mice.

## Conclusion de l'article

### 1.1. L'altération du métabolisme de la S1P dans le mélanome est en partie sous le contrôle de BRAF

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que le métabolisme de la S1P était considérablement modifié dans les cellules de mélanome en comparaison avec des mélanocytes sains. En effet, on observe une augmentation du taux d'ARNm codant pour la SK1, suggérant un mécanisme de régulation de l'expression de cette kinase au niveau transcriptionnel, se répercutant à l'échelle protéique avec augmentation de l'activité catalytique de l'enzyme. Cette augmentation d'expression de SK1 a pu être observée à la fois dans des lignées cellulaires et dans des tissus obtenus à partir de prélèvements chez des patients, et sont en accord avec l'étude de Madhunapantula et ses collaborateurs publiée récemment (Madhunapantula *et al.*, 2012). De façon intéressante, l'expression de son isoforme nucléaire, la SK2, n'est pas modifiée. D'autre part, la SGPP1, enzyme de dégradation de la S1P par recyclage de la sphingosine, tout comme la SPL (Colié *et al.*, 2009), voient leur expression diminuée dans les cellules de mélanome comparée aux mélanocytes. L'ensemble de ces altérations sont en faveur d'une accumulation de l'oncolipide S1P dans les cellules malignes comme cela a été rapporté pour de nombreux autres cancers (pour revue (Pyne and Pyne, 2010)). Toutefois, les mécanismes moléculaires sous-jacents de ces modifications d'expression restent à élucider. Nos résultats montrent une régulation de SK1 par la voie des MAPKs, activée de façon constitutive dans le mélanome par des mutations oncogéniques de BRAF ou NRAS, et corroborent l'activation de SK1 par ERK1/2 (Pitson *et al.*, 2003) ou par l'oncogène K-Ras<sup>G12V</sup> (Gault *et al.*, 2012). Le rôle oncogénique de la SK1 a été avancé à de nombreuses reprises par son action dans la promotion de la prolifération cellulaire et de la survie mais également dans la résistance à l'apoptose qui en résulte (pour revue (Ogretmen and Hannun, 2004)). De plus, elle intervient dans la transformation cellulaire médiée par H-Ras (Xia *et al.*, 2000). Cependant, il est intéressant de noter qu'au-delà de sa surexpression dans le cancer, aucune mutation ou amplification du gène codant pour la SK1 n'a été rapportée à ce jour, ouvrant le débat de son statut d'oncogène (Vadas *et al.*, 2008).

Nos données expérimentales placent cette enzyme en aval de la voie de signalisation médiée par ERK, position stratégique lui accordant un intérêt particulier en tant que cible thérapeutique. En effet, il a été montré que le traitement par des inhibiteurs pharmacologiques ou génétiques de cette enzyme permettait d'inhiber la croissance de différents types cellulaires et plus particulièrement la croissance tumorale de mélanome dans des modèles de xénogreffes chez le petit animal (Madhunapantula *et al.*, 2012). Cette inhibition permet également de sensibiliser des cellules, initialement résistantes, à l'apoptose induite par des agents cytotoxiques. De plus, la combinaison

d'inhibiteurs de SK avec le Sorafenib, inhibiteur multikinase, amplifie les effets inhibiteurs sur la croissance cellulaire et l'efficacité anti-tumorale de ces agents dans des modèles de xénogreffes de carcinome rénal et d'adénocarcinome pancréatique chez la souris (Beljanski *et al.*, 2011 a). Ainsi, l'inhibition de la SK1 dans les cellules tumorales permettrait de limiter, voire bloquer, les effets promoteurs de tumeur de la S1P en diminuant sa biosynthèse.

Compte tenu de la diminution d'expression des enzymes de dégradation de ce lysophospholipide dans le mélanome, le rétablissement de leur expression à un niveau suffisant pour contrer les effets de la SK pourrait être une solution alternative dans la lutte anti-cancéreuse. Cependant, cette proposition paraît difficilement envisageable tant que les mécanismes de régulation et d'activation de ces enzymes restent pas, ou peu, connus.

Les autres stratégies visant à bloquer les effets pro-tumoraux de la S1P consistent à empêcher son action extracellulaire, soit en ciblant directement le lipide par un anticorps neutralisant comme cela a été montré par le groupe de Sabbadini (Visentin *et al.*, 2006) et plus récemment par le groupe d'Ogretmen (Ponnusamy *et al.*, 2012), soit en utilisant des antagonistes des récepteurs à la S1P comme le FTY720 (LaMontagne *et al.*, 2006) (cf chapitre III - 2.6 de la revue générale).

## **1.2. La migration des cellules de mélanome est stimulée par la S1P produite par des fibroblastes adjacents**

De façon à priori surprenante, nos travaux montrent que la surexpression de SK1 dans les cellules de mélanome n'engendre pas d'effet sur la migration ni sur la prolifération cellulaires. Ces données se distinguent de la littérature par rapport à d'autres modèles de cancer puisque la voie SK1/S1P est généralement associée à ces processus cellulaires (pour revue (Pyne and Pyne, 2010)). Cependant, il est clairement établi que les effets médiés par la fixation de la S1P sur ses récepteurs sont dépendants des sous-types de récepteurs exprimés à la surface cellulaire et mis en jeu, pouvant ainsi varier selon le contexte et le modèle cellulaire (pour revue (Brocklyn, 2010)). De cette façon, la S1P a la capacité de promouvoir la migration de cellules de cancer gastrique par son interaction avec le S1PR3 (Yamashita *et al.*, 2006) alors qu'elle inhibe la migration de cellules de mélanome murin exprimant le S1PR2 (Arikawa *et al.*, 2003). Dans un autre modèle cellulaire de mélanome, la voie SK1/S1P a été montrée comme participant à la formation de lamellipode et à la migration cellulaire en association avec le S1PR1 (Maceyka *et al.*, 2008). Ainsi, l'analyse de l'expression des différents S1PRs dans nos différents modèles cellulaires permettrait, au moins en partie, de clarifier les effets observés.

Par ailleurs, la progression tumorale est reconnue comme résultant d'interactions évoluant entre les cellules cancéreuses et les cellules du stroma environnant, notamment les fibroblastes (cf chapitre II- de la revue générale et (Kalluri and Zeisberg, 2006)). Nos travaux démontrent qu'en effet, la co-incubation avec des fibroblastes cutanés stimule la migration de cellules de mélanome dans des modèles de co-culture *in vitro*, et cet effet varie avec la modulation du métabolisme de la S1P dans les fibroblastes. En effet, la potentialisation de la migration est exacerbée lorsque les fibroblastes surexpriment la SK1 ou présentent une diminution d'expression de la SPL après traitement par un siRNA, et l'effet inverse est observé lorsque les fibroblastes sont traités par un siRNA dirigé contre la SK1 ou sont génétiquement déficients en SK1 (*Sphk1*<sup>-/-</sup>). Ces effets sont inhibés par le VPC23019, antagoniste des récepteurs S1PR1 et S1PR3. Ainsi, ces données suggèrent que les fibroblastes sécrètent de la S1P dans le milieu extracellulaire et que cet oncolipide exercerait une action paracrine en interagissant avec l'un et/ou l'autre des récepteurs S1PR1/3 à la surface des cellules de mélanome afin d'induire leur migration. Ces observations soulignent le rôle clé joué par les fibroblastes dans la modulation du phénotype tumoral, et plus particulièrement le phénotype migratoire. Elles corroborent les données de la littérature obtenues pour d'autres modèles cellulaires, comme par exemple des cellules de cancer mammaire (Aprelikova *et al.*, 2012) ou des cellules d'adénocarcinomes gastriques (Fuyuhiko *et al.*, 2012) qui voient leur migration stimulée en présence de fibroblastes.

### **1.3. L'expression de SK1 par les cellules de mélanome promeut l'activation des fibroblastes adjacents**

Il a été montré que les interactions établies entre les fibroblastes et les cellules de mélanome en co-culture entraînaient des modifications du profil d'expression génique des fibroblastes (Gallagher *et al.*, 2005). Ceci est vérifié dans notre étude puisqu'on démontre une nette augmentation de l'expression de SK1 par les fibroblastes après 24h d'incubation avec du milieu conditionné issu de cellules de mélanome surexprimant la SK1. Cette augmentation d'expression s'accompagne d'une augmentation du taux de sécrétion de la S1P dans le milieu extracellulaire, formant ainsi une boucle d'amplification de la signalisation de la S1P au sein des interactions entre les cellules cancéreuses de mélanome et les fibroblastes cutanés. Cette communication intercellulaire est également illustrée par l'acquisition de caractéristiques d'activation par les fibroblastes après incubation avec du milieu conditionné issu de cellules de mélanome exprimant SK1. Ces propriétés comprennent l'acquisition du marqueur myofibroblastique  $\alpha$ -SMA et la production de protéases matricielles, MMP-2 et MMP-9. De façon intéressante, ces molécules ont également été retrouvées exprimées dans des fibroblastes issus de tumeurs mélaniques chez des patients en comparaison avec des fibroblastes sains. Concernant les mécanismes moléculaires, une

étude a montré que la régulation de l'expression de MMP-2 par la S1P dans des cellules endothéliales ferait intervenir le facteur de transcription ZNF580 (Sun *et al.*, 2010). D'autre part, la régulation de l'expression de MMP-9 par ce lysophospholipide impliquerait le récepteur S1PR3 couplé à une protéine G<sub>αq</sub> dans des cellules de cancer mammaire (Kim *et al.*, 2011). Pour ce qui est de l'α-SMA, la S1P induirait son expression via la kinase Rho dans des fibroblastes pulmonaires (Urata *et al.*, 2005), et passerait par le S1PR2 dans des cellules musculaires lisses après lésion artérielle (Grabski *et al.*, 2009). Les mécanismes de régulation mis en jeu dans nos modèles cellulaires restent cependant à élucider. En effet, le traitement des fibroblastes avec de la S1P exogène ne permet pas de reproduire les effets observés avec le milieu conditionné des cellules de mélanome exprimant SK1. Ceci suggère que les effets de la S1P sur l'activation des fibroblastes sont indirects et probablement médiés par d'autres facteurs. Des études récentes ont montré des interconnexions entre la S1P et d'autres voies de signalisation profibrotiques connues comme le TGF-β (Xin *et al.*, 2004) et le PDGF (Alderton *et al.*, 2001; Hobson *et al.*, 2001). Par exemple, il a été montré que le TGF-β était impliqué dans la différenciation myofibroblastique de fibroblastes pulmonaires et dermiques via l'activation de SK1 lors du processus de fibrose (Keller *et al.*, 2007; Kono *et al.*, 2007 b). De même, la S1P stimule la production de collagène dans des fibroblastes primaires cardiaques via un dialogue avec le TGF-β (Gellings Lowe *et al.*, 2009). Cette interconnexion entre la SK1 et le TGF-β font de ce dernier un candidat potentiel dans la médiation de l'activation des fibroblastes par la S1P au sein du tissu tumoral.

#### **1.4. L'expression de SK1 dans les fibroblastes dermiques favorise la progression tumorale**

Comme évoqué dans la revue générale, l'activation des fibroblastes est une étape importante de la progression tumorale et favorise les processus d'invasion et de dissémination. La voie de signalisation SK1/S1P, en induisant la différenciation myofibroblastique et la sécrétion de protéases matricielles participe activement à ces événements. Ce rôle fibrogénique de la S1P est également illustré chez les souris transgéniques surexprimant SK1 par un profond remodelage cardiaque associé à une fibrose du myocarde (Takuwa *et al.*, 2010).

Nos travaux montrent que l'absence de SK1 dans des fibroblastes co-injectés avec des cellules de mélanome dans le derme de souris se traduit par une réduction de la masse tumorale mais également du nombre de métastases, en comparaison avec la co-injection avec des fibroblastes sauvages qui a un effet nettement potentialisateur sur la croissance et la dissémination tumorales. Ces résultats mettent en évidence le rôle important de la voie SK1/S1P dans l'activation des fibroblastes péri-tumoraux et leur effet potentialisateur sur la croissance et l'invasion tumorales via la sécrétion de facteurs de croissance, de composants de la matrice extracellulaire et de protéases



matricielles, phénomène appelé stromagenèse. Cependant, reste à déterminer si les effets observés *in vivo* sont médiés par la S1P elle-même ou s'ils nécessitent l'implication d'autres facteurs, comme c'est le cas *in vitro*. L'utilisation d'un anticorps neutralisant ou d'agonistes/antagonistes des récepteurs S1PRs permettrait d'attester d'une action directe de ce lipide en extracellulaire via la fixation à ses récepteurs.

La diminution de la croissance tumorale observée lors de la co-injection avec des fibroblastes *Sphk1*<sup>-/-</sup> est encore plus marquée lorsque la déficience en SK1 est totale chez l'hôte, ce qui souligne les nombreux rôles joués par la S1P produite par les différents types cellulaires du microenvironnement et retrouvés au sein du tissu tumoral, qu'il s'agisse des cellules endothéliales et vasculaires, des cellules immunes et inflammatoires, ou des fibroblastes. La stromagenèse s'ajoute ainsi aux multiples actions de la S1P dans le cancer, qui comprennent son implication dans la croissance et la prolifération cellulaires, mais également dans l'induction de la vascularisation et de l'angiogenèse tumorales, la lymphangiogenèse et les processus inflammatoires (pour revue (Milstien and Spiegel, 2006; Sabbadini, 2006)). L'ensemble de ces données confirment l'intérêt de cibler la voie de signalisation de la S1P en thérapeutique anti-cancéreuse.

## **2. Etude de l'effet de la déficience en SK sur la dissémination du mélanome**

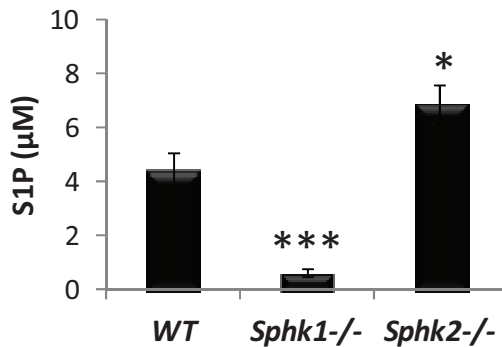
Les résultats décrits précédemment ont permis de mettre en évidence le rôle de la voie SK1/S1P dans la croissance et le phénotype invasif et migratoire du mélanome via le dialogue avec les fibroblastes stromaux. Comme le notait le chirurgien Stephen Paget il y a plus d'un siècle, le développement de métastases ne se fait pas au hasard mais a lieu dans certains sites qui lui sont favorables (Ribatti *et al.*, 2006). Il apparaît donc important d'étudier non seulement la tumeur mais également le tissu hôte afin d'expliquer, au niveau moléculaire, la formation préférentielle de métastases dans certains tissus. Afin d'étudier le rôle de la S1P dans la dissémination métastatique, des cellules de mélanome murin ont été injectées par voie intraveineuse à des souris déficientes pour l'une ou l'autre des isoformes de SK (SK1 ou SK2). Pour réaliser cette étude, un modèle murin de mélanome présentant un phénotype métastatique a également été injecté dans le derme de ces souris mutantes.

### **2.1. Effet de la déficience en SK sur les taux de S1P**

Différents modèles murins déficients pour SK1 ou SK2 ont été générés et décrits dans la littérature. Concernant les animaux *Sphk1*<sup>-/-</sup>, deux modèles décrits présentent une réduction du taux de S1P sérique de l'ordre de 50% alors qu'aucune modification ne semble avoir lieu au niveau tissulaire (Allende *et al.*, 2004; Zemmann *et al.*, 2006). Pour les souris *Sphk2*<sup>-/-</sup>, les données divergent

selon les modèles, l'un présente une réduction de 25% de la concentration en S1P dans le sérum (Kharel *et al.*, 2005) alors que pour l'autre modèle une augmentation de concentration, passant de 2  $\mu\text{M}$  chez les souris témoins à  $\sim 4 \mu\text{M}$  chez les *Sphk2*<sup>-/-</sup>, a été rapportée (Zemann *et al.*, 2006).

Afin de caractériser nos modèles mutants pour la SK, nous avons évalué les taux de S1P sérique par la technique ELISA chez des souris *Sphk1*<sup>-/-</sup> et *Sphk2*<sup>-/-</sup> et comparé ces taux à ceux d'animaux contrôles de même fond génétique C57BL/6 (Figure 28).



**Figure 28 - Concentration en S1P dans le sérum des souris.**

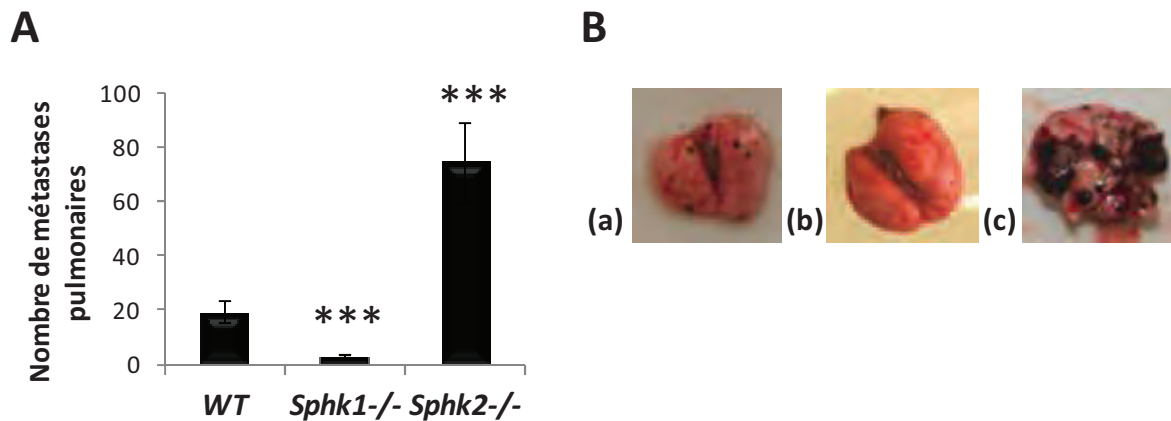
La S1P a été dosée par ELISA dans le sérum de souris sauvages (n=11), *Sphk1*<sup>-/-</sup> (n=11) et *Sphk2*<sup>-/-</sup> (n=10) après prélèvement de sang en rétro-orbitale. Les résultats correspondent à la moyenne des concentrations sériques  $\pm$ esm.

Les résultats obtenus montrent une réduction de plus de 80% du taux de S1P chez les souris *Sphk1*<sup>-/-</sup> par rapport aux souris sauvages, et vont donc dans le sens de ce qui a été publié pour les autres modèles. Concernant les souris *Sphk2*<sup>-/-</sup>, on constate une augmentation de l'ordre de 50% de leur concentration sérique en S1P en comparaison avec les souris sauvages, corroborant les données publiées par Zemann et ses collaborateurs (Zemann *et al.*, 2006) ainsi qu'une étude récente montrant que la déficience en *Sphk2* ou son inhibition par un inhibiteur pharmacologique chez la souris entraînait une élévation des taux de S1P circulante (Kharel *et al.*, 2012).

## 2.2. Effet de la déficience en SK sur la dissémination des cellules de mélanome par voie systémique

Afin d'analyser les effets de la déficience en SK1 ou SK2 sur la dissémination du mélanome, nous avons tout d'abord injecté des cellules de mélanome murin B16F10 dans la veine caudale des souris des différents groupes (sauvages, *Sphk1*<sup>-/-</sup> et *Sphk2*<sup>-/-</sup>). Ainsi, nous avons pu évaluer l'impact de la modulation des taux de S1P circulante de l'hôte sur la formation de métastases à partir des cellules directement présentes dans la circulation sanguine. A noter, les cellules de mélanome forment des métastases de façon préférentielle au niveau des poumons, tissus offrant probablement l'environnement le plus favorable pour adhérer et croître rapidement. De façon très intéressante, le nombre de métastases pulmonaires (Figure 29) est corrélé aux taux de S1P sérique pour chacun des groupes de souris. En effet, les souris *Sphk1*<sup>-/-</sup> développent un nombre très limité de métastases

pulmonaires par rapport aux souris sauvages. A contrario, les souris *Sphk2*<sup>-/-</sup> démontrent une formation nettement accrue de métastases pulmonaires (Figure 29), et présentent un envahissement quasi-total des tissus (reins, foie, ganglions, utérus, plèvre, viscères, tissus adipeux...).



**Figure 29 - Effets de la déficience en SK sur la formation de métastases pulmonaires par les cellules de mélanome.**

1.10<sup>5</sup> cellules de mélanome murin B16F10 ont été injectées dans la veine caudale de souris sauvages (n=24), *Sphk1*<sup>-/-</sup> (n=15) et *Sphk2*<sup>-/-</sup> (n=13) ; **(A)** le nombre de métastases pulmonaires a été évalué à J18-20, et **(B)** des photos de poumons de souris **(a)** WT, **(b)** *Sphk1*<sup>-/-</sup> et **(c)** *Sphk2*<sup>-/-</sup> ont été prises après sacrifice.

Ces résultats mettent en évidence le rôle de la S1P systémique dans la colonisation métastatique des cellules de mélanome au niveau pulmonaire. Les données obtenues chez les souris *Sphk1*<sup>-/-</sup> corroborent une très récente étude qui montre des résultats similaires avec des cellules de cancer de la vessie MB49 (Ponnusamy *et al.*, 2012). Ces effets inhibiteurs sont également retrouvés lors de l'administration de Sphingomab, anticorps monoclonal neutralisant la S1P, validant un effet direct de cet oncolipide sur le processus de dissémination des cellules cancéreuses.

Les résultats obtenus avec les souris *Sphk2*<sup>-/-</sup> soutiennent le statut d'inhibiteur de croissance de SK2 déjà évoqué dans la littérature par une étude montrant que la surexpression de cette enzyme dans différents types cellulaires induisait l'apoptose (cf chapitre III-2.1.1.3.3. de la revue générale et (Liu *et al.*, 2003)). Cependant, les données de la littérature concernant le rôle de SK2 dans le cancer sont très controversées. En effet, il a été montré que l'inhibition de l'expression de SK2 par un siRNA inhibait la prolifération de cellules de glioblastome (Van Brocklyn *et al.*, 2005) et empêchait la migration de cellules de cancer mammaire induite par l'EGF (Hait *et al.*, 2005). De même, l'utilisation d'un inhibiteur sélectif de SK2, le composé ABC294640, a montré une efficacité anti-tumorale dans des modèles de tumeurs chez la souris (Beljanski *et al.*, 2011 a; b; French *et al.*, 2010). Par ailleurs,

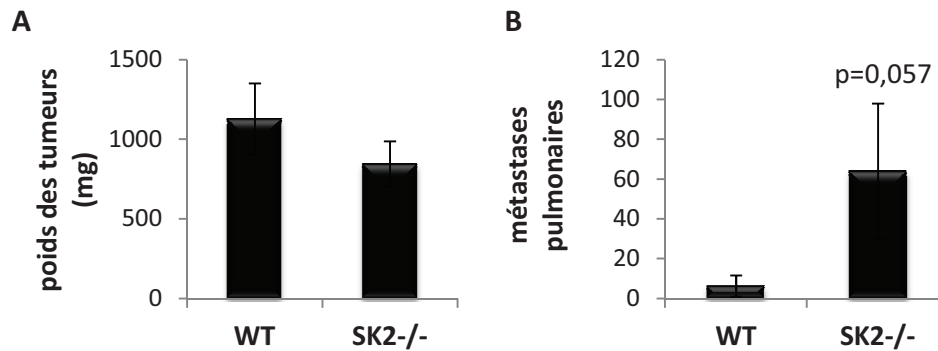
des cellules MCF-7 déficientes pour SK2 présentent un retard de croissance significatif lorsqu'elles sont xéno greffées chez la souris (Weigert *et al.*, 2009).

Des travaux récents ont montré que, contrairement à l'inhibition de SK1 qui entraînait une élévation des taux cellulaires de céramides, l'inhibition de SK2 n'engendrait pas de tels effets mais se traduisait à contrario par une augmentation de production de S1P associée à une augmentation de l'expression et de l'activité de SK1. Toutefois, cette réponse, de même que l'ajout de S1P exogène, n'a pas permis de lever l'inhibition de prolifération, migration ou invasion liée à l'ablation de SK2 (Gao and Smith, 2011).

Ainsi, il apparaît clairement que les fonctions de SK1 et de SK2 ne sont pas toujours redondantes et que les deux enzymes peuvent engendrer des effets différents voire opposés selon les modèles et les conditions d'étude. Ceci peut notamment s'expliquer par leur différente localisation subcellulaire et par conséquent différents pools de S1P au sein de la cellule.

### **2.3. Effet de la déficience en SK2 sur le développement de mélanome métastatique**

Afin d'évaluer les effets de la déficience en SK2 sur la progression de mélanome et le processus métastatique dans un modèle plus physiologique que l'injection systémique de cellules, nous avons utilisé la lignée B16BL6, un modèle de cellules murines de mélanome caractérisées pour leur capacité à disséminer et former des métastases après injection intradermique. Les résultats de ces expériences montrent que la croissance de la tumeur primitive, évaluée par la mesure du volume tumoral tous les 2-3 jours et par le poids tumoral lors du sacrifice à J21 (Figure 30 A), n'est pas modifiée chez les souris *Sphk2*<sup>-/-</sup> par rapport aux souris contrôles. De même, l'évaluation de l'atteinte ganglionnaire ne démontre aucune différence entre les deux groupes de souris. Cependant, une nette différence a pu être constatée au niveau de la formation de métastases pulmonaires, évaluée à l'échelle macroscopique. En effet, même si le nombre de souris ayant développé des métastases est quasi identique pour les deux groupes (3/11 pour les WT et 4/11 pour les SK2<sup>-/-</sup>), le nombre de métastases pulmonaires développées chez les souris concernées est clairement supérieur pour les souris SK2<sup>-/-</sup>, avec une moyenne de 64 métastases par souris, par rapport aux souris contrôles présentant en moyenne 6,3 métastases par animal (Figure 30 B). Le nombre d'animaux étant cependant trop faible, il ne permet pas d'obtenir une significativité statistique.



**Figure 30 - Effet de la déficience en SK2 sur la progression de mélanome murin B16BL6**

5.10<sup>5</sup> cellules B16BL6 ont été injectées dans le derme de souris sauvages (WT n=11) et *Sphk2*<sup>-/-</sup> (SK2<sup>-/-</sup> n=11) et les souris ont été sacrifiées à J21 ; **(A)** les tumeurs ont alors été pesées et **(B)** les métastases pulmonaires comptées, les résultats représentés correspondent au nombre moyen de métastases par souris ayant développé des métastases. Les résultats correspondent à la moyenne  $\pm$ esm.

Ces données confirment l'impact stimulateur de la déficience en SK2 sur le développement métastatique de mélanome observé dans les modèles précédents de dissémination après injection systémique. Ainsi, des modulations du métabolisme de la S1P dans le microenvironnement tumoral modifient le comportement des cellules cancéreuses, mettant en évidence son implication dans la communication intercellulaire entre les tissus de l'hôte et le tissu tumoral. Les mécanismes moléculaires responsables restent à élucider. Cependant, une étude récente a mis en évidence la capacité des cellules de mélanome B16 à préparer une niche pré-métastatique au niveau des futurs sites de métastases, principalement les poumons, via l'axe S1P/S1PR1/Stat3 (Deng *et al.*, 2012). De plus, la surexpression du S1PR1 dans les cellules tumorales induirait la production de fibronectine par les fibroblastes, connus pour jouer un rôle important dans la formation de ces niches pré-métastatiques notamment en induisant le recrutement de cellules progénitrices endothéliales ou hématopoïétiques (Kaplan *et al.*, 2005; Orimo *et al.*, 2005). Par ailleurs, il a également été montré que les cellules de mélanome B16 injectées en sous-cutané chez des souris induisaient une augmentation d'expression de MMP9 au niveau des poumons, principalement dans les cellules endothéliales et les macrophages via le VEGFR-1, et favorisait la formation de métastases pulmonaires (Hiratsuka *et al.*, 2002). Nos résultats ayant montré un lien entre SK1/S1P et MMP-9, on peut donc imaginer que, chez les souris *Sphk2*<sup>-/-</sup>, la compensation par SK1 traduite par des taux élevés de S1P circulante favoriserait la préparation de sites pré-métastatiques via l'axe S1PR1/Stat 3 induisant l'activation des fibroblastes, la production de fibronectine et la sécrétion de MMP-9. Ainsi, ceci pourrait expliquer l'augmentation du nombre de métastases observée chez les souris *Sphk2*<sup>-/-</sup> par rapport aux souris contrôles, en soulignant le rôle clé de la S1P dans le développement métastatique du mélanome et son intérêt en tant que cible thérapeutique.



# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---
















## I. Conclusion générale

L'objectif de notre étude était d'étudier le rôle de la S1P dans les interactions entre les cellules de mélanome et les fibroblastes du stroma.

Grâce à des outils génétiques tels que des souris déficientes pour chacune des isoformes de sphingosine kinase, nous avons pu évaluer l'impact de la modulation du métabolisme de la S1P de l'hôte sur le développement et la progression du mélanome (Tableau 7).

souris	S1P sérique	Développement tumoral	métastases
contrôles			
 Sphingosine Kinase 1			
 Sphingosine Kinase 2			

**Tableau 7 - Récapitulatif de l'effet de la déficience en sphingosine kinase sur le développement et la dissémination de mélanome chez la souris.**

Nous avons montré que la déficience en SK1 était associée à une diminution de la concentration sérique en S1P et se traduisait par une réduction de la croissance et de la dissémination métastatique du mélanome. A contrario, la déficience en SK2 s'accompagnait d'une augmentation du taux de S1P circulante et d'une stimulation de l'invasion à distance des cellules tumorales.

De plus, nous avons mis en évidence l'importance des fibroblastes adjacents aux cellules cancéreuses et leur métabolisme de la S1P pour la croissance, la migration et l'invasion du mélanome. Les résultats sont synthétisés dans la Figure 31.

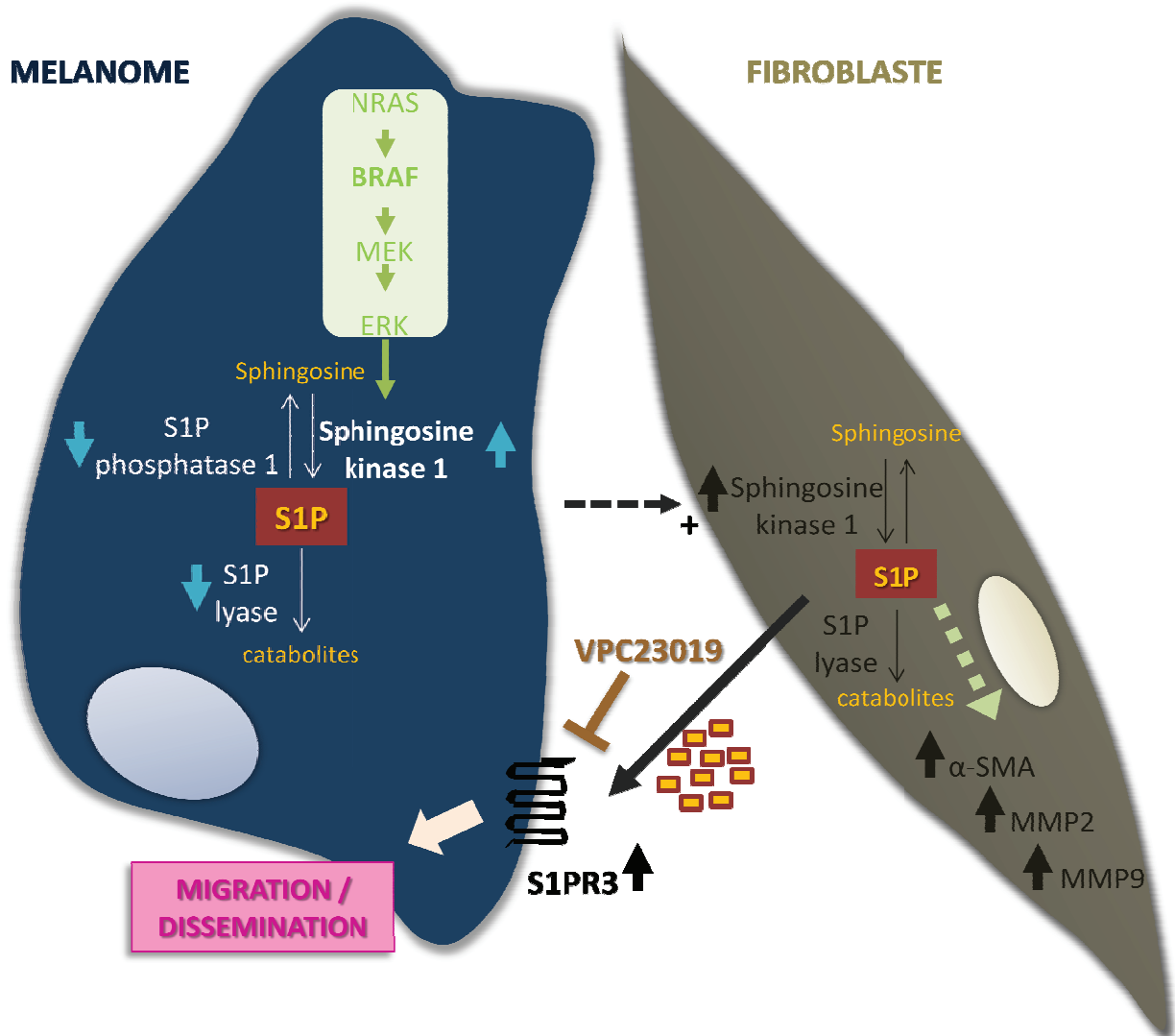


Figure 31 - Schéma récapitulant l'implication de la S1P dans les interactions mélanome-fibroblaste.

*In vivo*, nous avons montré que la co-injection intradermique de cellules de mélanome avec des fibroblastes potentialisait le développement de mélanome en augmentant la croissance tumorale et en induisant la dissémination métastatique à distance dans les tissus pulmonaires. Ces effets sont inhibés lorsque les fibroblastes présentent une déficience pour SK1.

*In vitro*, nos travaux démontrent la capacité de fibroblastes dermiques à stimuler la migration des cellules de mélanome selon un mécanisme dépendant de la S1P. En effet, la migration des cellules de mélanome est augmentée en présence de fibroblastes dans lesquels les taux de S1P sont élevés (par surexpression de la SK1 ou inhibition de la SPL) alors qu'elle est diminuée en présence de fibroblastes ayant de faibles taux de S1P (par inhibition génétique de la SK1). La migration des cellules de mélanome est de plus stimulée par l'addition de S1P exogène et peut être inhibée par un

antagoniste des récepteurs S1PR1/3. Elle n'est par contre pas modifiée par la surexpression ou l'inhibition d'expression de la SK1 directement au sein des cellules tumorales.

La communication bidirectionnelle entre les cellules de mélanome et les fibroblastes est aussi illustrée par la capacité qu'ont les cellules tumorales à modifier l'expression génique et le phénotype de fibroblastes, effets médiés de façon indirecte par la voie SK1/S1P. L'incubation de fibroblastes cutanés primaires avec du milieu conditionné de cellules de mélanome surexprimant la SK1 entraîne une augmentation de l'expression de SK1 dans des fibroblastes avec augmentation de sécrétion de S1P dans le milieu extracellulaire. De plus, suite à cette co-incubation, les fibroblastes acquièrent un phénotype myofibroblastique avec l'expression de l' $\alpha$ -SMA et production des métalloprotéases matricielles MMP-2 et MMP-9. Ces caractéristiques d'activation sont retrouvées dans des fibroblastes isolés à partir d'exérèses de mélanome.

L'importance de la signalisation de la S1P dans le mélanome est d'autant plus marquée par le fait que le métabolisme de cet oncolipide est fortement altéré dans les cellules tumorales mélaniques comparées à des cellules saines. L'analyse de différentes lignées cellulaires de mélanome ainsi que de tissus tumoraux issus de patients atteints de mélanome nous a permis de montrer que la SK1 était surexprimée dans les cellules malignes en comparaison avec des contrôles sains et que les enzymes de dégradation de ce lysophospholipide étaient, à l'inverse, moins exprimées. Une des explications de ces altérations est que la SK1 est stimulée par les MAPKs, voie de signalisation constitutivement active dans la majorité des mélanomes.

L'ensemble de ces observations souligne l'implication de la voie de signalisation de la S1P dans le développement et la progression du mélanome. Son action sur la stromagenèse est un nouvel élément à prendre en compte et représente un intérêt thérapeutique important dans la lutte contre le mélanome.

## II. Perspectives

Bien que ces travaux apportent une meilleure compréhension du rôle de la S1P dans les interactions mélanome-stroma, plusieurs points nécessitent d'être approfondis.

### **1. Altérations du métabolisme de la S1P dans le mélanome : mécanismes de régulation et cibles intracellulaires**

Nous montrons une altération du métabolisme de la S1P dans les cellules de mélanome en comparaison avec des mélanocytes sains, en faveur d'une accumulation de la S1P dans les cellules malignes. Pour déterminer si la S1P s'accumule dans ces cellules ou si elle est sécrétée dans le milieu extracellulaire, les taux de S1P pourront être mesurés par spectrométrie de masse en tandem dans les différentes lignées de mélanome ainsi que dans les milieux de culture. Ces analyses pourront être également réalisées sur des prélèvements tumoraux issus de patients atteints de mélanome. Afin d'élucider les mécanismes d'action intracellulaire de la S1P, plusieurs cibles moléculaires potentielles de ce lysophospholipide seront testées. En effet, TRAF2, PKC $\delta$ , PHB-2, BACE1 et les HDACs ont été décrites récemment comme étant régulées dans la signalisation de la S1P dans différents modèles cellulaires (cf chapitre III-2.3.2. de la revue générale) et pourront d'être évaluées dans les cellules de mélanome.

Nos résultats montrent également une augmentation de l'expression protéique de la SK1 en aval de l'activation de la voie des MAPKs, mais le mécanisme de régulation de son expression au niveau transcriptionnel reste à élucider. L'étude de l'activité du promoteur de SPHK1 nous permettra d'examiner quels sont les facteurs responsables de sa stimulation mais aussi de tester des inhibiteurs pharmacologiques qui permettraient d'inhiber l'expression de cette enzyme dans les cellules cancéreuses. Des études ont montré une régulation de SK1 par l'hypoxie via des éléments de réponse HRE au niveau de son promoteur (Ader *et al.*, 2009); cette hypothèse mérite d'être vérifiée dans le mélanome. Par ailleurs, ces études pourront également être menées dans les CAFs puisque nous montrons une augmentation de l'expression de la SK1 dans ces cellules comparées à des fibroblastes cutanés sains or les mécanismes de cette activation restent inconnus.

D'autre part, il serait intéressant de déterminer les mécanismes de régulation de l'expression des enzymes de dégradation de la S1P, les SPPs et la SPL. Cette étude, au-delà d'une meilleure compréhension des processus moléculaires régissant les taux de S1P, permettrait d'établir des stratégies visant à les activer dans les cellules cancéreuses afin de rétablir l'équilibre du rhéostat sphingolipidique céramide/S1P et limiter la croissance, la prolifération et la migration des cellules tumorales.

## 2. Sécrétion de S1P et action extracellulaire

Nos travaux mettent en évidence la capacité à la fois des cellules de mélanome et des fibroblastes de sécréter la S1P dans le milieu extracellulaire pour favoriser respectivement l'activation des fibroblastes et la migration des cellules tumorales. Il est donc important d'examiner les mécanismes de sécrétion de ce lipide et les transporteurs impliqués dans nos modèles cellulaires. Plusieurs transporteurs ABC ont été proposés (cf chapitre III - 2.2.2. de la revue générale), l'inhibition spécifique de ces protéines par des approches génétiques ou pharmacologiques permettra d'identifier les molécules responsables de la sortie de S1P dans nos modèles cellulaires. Le blocage de cette sécrétion permettrait d'éliminer les actions extracellulaires de la S1P et pourrait freiner la progression tumorale. Cette hypothèse pourra être testée dans différents modèles de co-culture *in vitro* mais également dans des modèles de tumorigenèse *in vivo* après inhibition du/des transporteur(s) dans les cellules tumorales et/ou stromales.

Comme évoqué précédemment, nous montrons que la S1P extracellulaire provenant des fibroblastes peut avoir un effet direct sur les cellules de mélanome afin d'induire leur migration. Cette action paracrine est exercée via l'interaction de ce lysophospholipide avec ses récepteurs puisqu'elle est inhibée par le VPC23019, antagoniste des S1PR1/3. L'utilisation d'antagonistes spécifiques ou l'inhibition de l'expression de chacun de ces récepteurs par des siRNAs permettra de caractériser plus précisément lequel d'entre eux est mis en jeu dans nos conditions expérimentales. Les voies de signalisation qui pourraient induire la migration des cellules de mélanome en aval de l'activation des récepteurs pourront également être examinées. Notamment, les petites protéines G comme Rho et Rac ont été impliquées dans la migration cellulaire induite par les récepteurs S1PR1 et S1PR3 (cf chapitre III-2.4.3 de la revue générale). Nous pourrions ainsi tester les effets de l'inhibition des récepteurs et de la signalisation mise en jeu, par l'utilisation d'antagonistes spécifiques ou par des approches génétiques, sur le développement et la progression du mélanome dans des expériences de migration et d'invasion à la fois *in vitro* et *in vivo*.

D'autre part, nous montrons que l'activation des fibroblastes observée après incubation avec du milieu conditionné issu de cellules de mélanome surexprimant la SK1 n'est pas reproduite par un traitement avec de la S1P exogène. Il serait donc intéressant d'évaluer le profil d'expression des S1PRs dans ces cellules pour déterminer si l'absence de réponse directe à la S1P est simplement due à un défaut d'expression de ses récepteurs à la surface cellulaire ou si l'intervention d'autre(s) facteur(s), comme par exemple le TGF- $\beta$  ou le PDGF, est nécessaire. En effet, ces deux facteurs de croissance sont connus pour induire à la fois la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes mais également l'activation de la SK1.

### **3. S1P et migration des fibroblastes**

Le recrutement de fibroblastes suivi de leur activation au sein de la tumeur est une étape clé du développement tumoral et les acteurs moléculaires qui en sont responsables ne sont pas encore bien définis (cf chapitre II-4.1. de la revue générale). Des expériences visant à évaluer la migration de fibroblastes dermiques en présence de S1P exogène ou de cellules de mélanome modifiées ou non pour le métabolisme de la S1P permettraient de déterminer si ce lysophospholipide participe à ce recrutement cellulaire, complétant ainsi son action sur la stromagenèse.

### **4. S1P dans les interactions mélanome-fibroblaste *in vivo***

Nos résultats de tumorigenèse *in vivo* ont mis en évidence que la co-injection orthotopique de cellules de mélanome avec des fibroblastes potentialisait la croissance et la dissémination tumorales. Ces effets sont inhibés en présence de fibroblastes déficients en SK1. Une question importante serait de déterminer si cette inhibition serait majorée avec des fibroblastes double-déficients en SK1/2 qui présentent un déficit total pour la voie de synthèse de la S1P. Au contraire, il serait intéressant de tester si le développement tumoral pourrait être accéléré en présence de fibroblastes déficients pour la SPL dans lesquels la dégradation de la S1P est abolie. Ces différentes combinaisons permettraient ainsi d'examiner l'impact de chacune des enzymes du métabolisme de la S1P sur la capacité des fibroblastes à promouvoir la progression du mélanome. Ces différents modèles cellulaires pourront également être utilisés pour compléter les analyses de migration *in vitro*.

De plus, la part des autres composants cellulaires (cellules endothéliales, macrophages, cellules immunes) présents au niveau du stroma réactif lors de l'envahissement du derme par des cellules de mélanome devra être évaluée. Par exemple, nous pourrions examiner si la S1P extracellulaire peut être impliquée dans le recrutement de macrophages ou leur polarisation. Des résultats préliminaires d'analyses par PCR array ont permis de révéler que la co-culture avec des cellules de mélanome surexprimant la SK1 induirait une augmentation d'expression de CXCL9 par des fibroblastes dermiques et de CCL2 par des macrophages. Pour les effets sur l'angiogenèse tumorale, les travaux publiés par Visentin et ses collaborateurs avaient montré que le blocage de l'action extracellulaire de la S1P par l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre ce lysophospholipide permettait d'inhiber ce processus dans des modèles murins de mélanome (cf chapitre III-2.4.5 de la revue générale).

L'implication de la S1P circulante dans les processus de dissémination métastatique, observés lors des co-injections intradermiques mais également dans les modèles d'injections

intraveineuses, pourrait être validée par l'utilisation de l'anticorps monoclonal neutralisant ce lysophospholipide dans la circulation. De plus, une collaboration établie avec le Dr Andrea Huwiler (Institut de pharmacologie de Bern, Suisse) nous permet d'envisager une autre stratégie qui consiste à administrer une SPL procaryote issue de *Symbiobacterium thermophilum* ayant démontré une activité de dégradation de l'ordre de 70% de la S1P plasmaticque après injection par voie intraveineuse chez la souris (Huwiler *et al.*, 2011). Cette approche nous permettra d'évaluer l'efficacité anti-métastatique de cette enzyme et de valider son potentiel thérapeutique.

### **5. Effets de la modulation du métabolisme de la S1P des fibroblastes sur la chimiorésistance**

Le mélanome est un cancer connu pour sa résistance aux thérapies conventionnelles. D'autre part, il a été montré que les fibroblastes contribuaient à cette chimiorésistance (Flach *et al.*, 2011). Nous avons montré que la modulation du métabolisme de la S1P dans les fibroblastes entraînait des changements phénotypiques des cellules de mélanome, notamment le phénotype migratoire. Il serait donc à présent intéressant d'évaluer les effets de telles modulations sur la résistance des cellules de mélanome vis-à-vis d'agents chimiothérapeutiques. Ainsi, nous pourrions déterminer si l'inhibition de la SK1 dans les fibroblastes permettrait de sensibiliser les cellules de mélanome à des agents cytotoxiques comme la dacarbazine, la fotémustine ou le vémurafenib et si l'inhibition de la SPL, à l'inverse, engendrerait une résistance. Pour cela, différents modèles d'étude pourront être utilisés : co-culture en contact direct ou indirect, culture des cellules sous forme de sphéroïdes ou modèles de reconstruction de peau.





# MATERIELS ET METHODES

---



## **REACTIFS**

Les milieux de culture DMEM (glucose 4,5 g/L) et RPMI, la trypsine-EDTA, le sérum de veau fœtal (SVF) et le G418 proviennent de PAA (Cergy-Pontoise, France). Le VPC23019 vient d'Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL). La sphingosine-1-phosphate est de chez Matreya (Pleasant Gap, PA) et la D-érythro-[3-<sup>3</sup>H]Sphingosine (23 Ci/mmol) de chez Perkin Elmer. Les autres réactifs proviennent de Sigma (Lisle d'Abeau, France).

## **CULTURE CELLULAIRE**

Les lignées cellulaires A375, B16F0, B16F10 et HEK293T ainsi que les mélanocytes épidermiques néonataux primaires PSC-200-012 proviennent de l'ATCC. Les cellules ont été décongelées et passées selon les recommandations de l'ATCC. Les mélanocytes primaires adultes NHEM-M2 et juvéniles NHEM-B ont été achetés chez Lonza (Amboise, France). Les cellules WM-266.4 et COLO829 nous ont été données par le Pr. R. Marais (Londres, UK). Les cellules UACC-257, Mel-Juso, WM-115, G361 et SK-Mel28 proviennent des laboratoires Pierre Fabre (Toulouse, France) ; les cellules IC8 viennent de chez le Dr. J. Portoukalian (Lyon, France). Les mélanocytes murins melan-a nous ont été donnés par le Dr. D. Bennett (Londres, UK). Les fibroblastes cutanés ont été isolés à partir de derme de patients sains (Laboratoire de Biochimie, CHU Toulouse).

Les lignées cellulaires de mélanome humain ont été cultivées dans du milieu RPMI (UACC-257, Mel-Juso, WM-115, WM-266.4, COLO829 and G361) ou DMEM (IC8, A375, SKMel28) contenant 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté, dans une atmosphère humide à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub>.

## **ISOLEMENT DES FIBROBLASTES DERMiques MURINS**

La peau des souris a été lavée deux fois dans du DMEM contenant 10% de SVF et des antibiotiques puis placée dans une boîte de Pétri, le derme vers le haut. Après avoir retiré le gras à l'aide d'un scalpel, la peau a été placée dans une nouvelle boîte de Pétri, derme face au fond, puis coupée en morceaux de 2mm qui ont été distribués et laissés sécher et adhérer pendant environ 15 minutes. Les explants ont ensuite été immergés de milieu DMEM contenant 10% de SVF et des antibiotiques. Le milieu a été changé tous les trois jours jusqu'à ce que les fibroblastes puissent être décollés à la trypsine.

## **TRANSFECTION DES CELLULES**

Les cellules HEK293T ont été transfectées de façon transitoire par un plasmide codant pour la forme sauvage de BRAF ou pour la forme mutée BRAF<sup>V600E</sup> en utilisant le réactif de transfection JetPEI (Polyplus transfection) selon les recommandations du fournisseur.

Les cellules COLO829 et melan-a ont été transfectées par les plasmides pcDNA3.1-SPHK1 WT ou G82D (dons du Dr. SM. Pitson, Adelaide, Australie) et les transfectants stables ont été sélectionnés par leur résistance à 750 µg/ml de G418.

Des pools de 4 séquences siRNAs contrôles ou spécifiques de SPHK1, SGPL1 ou BRAF (ON-TARGETplus SMARTpool; Dharmacon) ont été utilisés pour les expériences d'interférence ARN. La transfection transitoire des cellules par les siRNAs a été réalisée avec le réactif HiPerfect (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur et l'efficacité d'inhibition a été évaluée 48h après la transfection.

## **TEST DE CICATRISATION *IN VITRO***

Les cellules de mélanome ont été cultivées à confluence en plaques 24 puits dans du milieu RPMI dépourvu de SVF, et une plaie a été réalisée à l'aide d'un embout de pipette à t=0. Au bout de 24h, des photos ont été prises et la migration a été évaluée.

## **TEST DE MIGRATION EN CHAMBRE**

La migration des cellules de mélanome a été évaluée en utilisant des inserts FluoroBlok (BD Biosciences, Bedford, MA) composés d'une membrane avec des pores de 8 µM. Les fibroblastes ont étéensemencés dans des plaques 24 puits (chambre inférieure) et incubés avec du DMEM dépourvu de SVF pendant 24h. Ensuite,  $1.10^5$  cellules de mélanome A375-GFP ont été suspendues dans 200 µL de DMEM etensemencées dans l'insert (chambre supérieure). Après 24h de co-incubation, la migration a été déterminée en quantifiant la fluorescence des cellules ayant migré sur la face inférieure des inserts.

## **PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL**

L'ARN de cellules non confluentes de lignées de mélanome humain et des mélanocytes épidermiques normaux dérivés de peau adulte (NHEM-M2) ou de prépuce juvénile (NHEM-B) a été extrait avec le kit RNeasy (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur et soumis à un traitement par la DNase I (Qiagen). La qualité des ARNs a été évaluée par électrophorèse automatisée (Experion; Bio-Rad). 2 µg d'ARN ont été retro-transcrits en utilisant la Superscript II (Invitrogen) et 25 ng d'ADNc ont

été utilisés pour la PCR quantitative. Les réactions ont été effectuées en triple en utilisant le QuantiFast SYBR Green Master Mix et les QuantiTect Primer Assays (Qiagen) et réalisées sur le StepOne+ instrument (Applied Biosystems) en utilisant la technologie FAST. Les analyses d'expression des ARNm ont été obtenues par la méthode de quantification comparative  $\Delta\Delta C_t$  après normalisation avec les gènes de ménage TBP, TFRC et  $\beta$ -actine.

#### **MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE SPHK1**

L'activité SPHK1 a été déterminée comme décrit précédemment avec des modifications mineures (Lavieu *et al.*, 2006). Les monocouches de cellules ont été lavées avec du PBS froid, récoltées et sédimentées par centrifugation. Les culots cellulaires ont ensuite été resuspendus dans 100  $\mu$ L de tampon de lyse (20 mM Tris, pH 7.4, 20% glycérol, 1 mM EDTA, 120 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, 40 mM  $\beta$ -glycérophosphate, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 15 mM NaF, 1 mM PMSF, 1% PIC, 0.5 mM 4-déoxyypyridoxine). Après sonication, la concentration protéique a été déterminée par la méthode de Bradford. 100  $\mu$ g de protéines ont été incubés avec 1 mM de D-érythrospingosine dans du Triton X-100 5%, 20 mM d'ATP et du [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (10  $\mu$ Ci dissouts dans 200 mM de  $\text{MgCl}_2$ ) pendant 30 min à 37°C dans un volume final de 200  $\mu$ L. La réaction a été arrêtée par ajout de 20  $\mu$ L de HCl 1N et 800  $\mu$ L de chloroforme/méthanol/HCl (100:200:1, v/v). Après agitation, 250  $\mu$ L de chloroforme et 250  $\mu$ L de KCl 2 M ont été ajoutés, les phases ont ensuite été séparées par centrifugation. La phase organique a été évaporée et resuspendue dans un mélange chloroforme/méthanol (2:1, v/v). Les lipides ont été séparés en chromatographie sur couche mince de silice (Whatman) par un mélange de 1-butanol/méthanol/acide acétique/eau (80:20:10:20, v/v). La S1P marquée a été visualisée en utilisant un PhosphorImager (Typhoon) et quantifiée avec le logiciel ImageQuant.

#### **MESURE DE LA SECRETION DE S1P**

Les cellules cultivées en plaque 6 puits ont été incubées avec de la D-érythro-[ $^3\text{H}$ ]Sphingosine (1.5  $\mu$ M, 0.45  $\mu$ Ci) pendant 10 min. Le milieu a ensuite été retiré, les cellules lavées avec du PBS froid et incubées avec du milieu sans sérum pendant 2h à 37°C. Une extraction au chloroforme-méthanol en condition alcaline a permis d'isoler les lipides du milieu et des cellules, puis les phases ont été séparées comme déjà décrit (Mitra *et al.*, 2007). Les résultats sont exprimés en pmoles de S1P libérée.

#### **ANALYSES PAR WESTERN BLOT**

Les extraits protéiques ont été préparés par sonication des culots cellulaires dans du tampon RIPA (Tris 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, Triton X100 1%, sodium désoxycholate 1%, SDS 0.1%, EDTA 5 mM, DTT 1 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM,  $\beta$ -glycérophosphate 10 mM, NaF 50 mM et 0.1 mM PMSF avec un cocktail

d'inhibiteurs de protéases). Des quantités égales de protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (10-15%) en conditions dénaturantes (SDS) puis transférées sur membrane de nitrocellulose (Bio-Rad, Hercules, CA). La révélation a été réalisée par chimioluminescence à l'aide du kit de détection ECL de Pierce (Interchim). Les anticorps polyclonaux dirigés contre SK1, BRAF, Vimentine, ppERK et ERK proviennent de Cell Signaling Technology, les anticorps dirigés contre SGPL1 et  $\alpha$ -SMA sont de chez Sigma et les anticorps monoclonaux dirigés contre les MMPs, S1PR1 et S1PR3 sont de chez Epitomics. Tous ont été utilisés à une dilution de 1/1000. Un anticorps anti- $\beta$ -actine (Cell Signaling) a été utilisé pour le contrôle de dépôt.

#### **DOSAGE DE LA S1P SÉRIQUE**

Les taux de S1P sérique ont été mesurés en utilisant un kit ELISA S1P (Echelon Biosciences) selon les recommandations du fournisseur.

#### **ALLOGREFFES DE TUMEURS CHEZ LES SOURIS**

L'expérimentation animale a été réalisée en accord avec la directive européenne 86/609/EC et dans des conditions conformes, approuvées par comité d'éthique régional (protocole 09/858/14/10).

$5 \cdot 10^5$  cellules B16BL6,  $3 \cdot 10^5$  cellules B16F10 seules, ou  $1 \cdot 10^5$  B16F10 avec  $2 \cdot 10^5$  fibroblastes, ont été injectées en intradermique sur le flanc de souris C57BL/6 femelles sauvages (Janvier, Le Genest-St-Isle, France), *Sphk1*<sup>-/-</sup> ou *Sphk2*<sup>-/-</sup> (Pushparaj *et al.*, 2009) âgées de 8 semaines. Les tumeurs ont été mesurées tous les 3 fois par semaine à l'aide d'un pied à coulisse et les volumes ont été calculés en utilisant la formule : longueur x largeur<sup>2</sup> x  $\pi/6$  comme décrit précédemment (Vasseur *et al.*, 2002). Les souris ont été sacrifiées au bout de 19-20 jours après injection, les tumeurs ont été pesées et le nombre de métastases a été évalué de façon macroscopique.

#### **ETUDE DE DISSEMINATION DES CELLULES DE MELANOME**

$1 \cdot 10^5$  cellules B16F10 ont été injectées dans la veine caudale de souris femelles âgées de 8-10 semaines. La formation de métastases a été évaluée 18-20 jours après injection.

#### **ANALYSE IMMUNOHISTOCHEMIQUE**

Les échantillons tissulaires ont été préparés comme précédemment décrit (Asnacios *et al.*, 2008) et les lames ont été traitées sur l'appareil Techmate Horizon (Dako, Carpinteria, CA). L'anticorps primaire dirigé contre la SK1 (Sigma Prestige Antibodies) a été incubé 1h à température ambiante et la révélation a été réalisée avec le système En Vision™ (DAKO, Glostrup, Denmark) selon les recommandations du fournisseur, le substrat chromogénique étant la 3,3'-diaminobenzidine. Une

contre-coloration a été réalisée avec de l'hématoxyline. Tous les échantillons ont été traités de façon identique selon des procédures automatisées afin d'assurer une cohérence entre expériences successives. Le score attribué au pourcentage de cellules marquées a été multiplié avec celui attribué à l'intensité du marquage afin d'obtenir un score d'immunoréactivité (IRS).

#### **ANALYSES STATISTIQUES**

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  esm. Le test *t* de Student a été utilisé pour les comparaisons statistiques des groupes et les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque  $p < 0,05$  (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).





# ANNEXES

---



## LISTE DES ABREVIATIONS

**3D** : trois dimensions  
**A-SMA** : alpha-Smooth Muscle Actin  
**ABC-transporter** : transporteur ATP-binding Cassette  
**ADN** : Acide Désoxyribonucléique  
**AKT** : cf PKB  
**ALCAM** : Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule  
**ALMM** : Acral lentiginous Malignant Melanoma  
**AMPc** : Adénosine monophosphate cyclique  
**AOM/DSS** : azoxymethane/dextran sodium sulfate  
**ARF** : Alternative Reading Frame of the INK4A locus  
**ARNm** : Acide Ribonucléique messenger  
**ATF2** : Activating Transcription Factor 2  
**ATP** : Adénosine Tri-phosphate  
**Bad** : Bcl-2-associated death promoter  
**Bax** : Bcl-2 associated X protein  
**Bcl-2** : B-cell lymphoma 2  
**Bcl-xL** : B-cell lymphoma extra-large  
**BCR-ABL** : Breakpoint Cluster Region - Abelson  
**BH** : Bcl-2 Homology  
**BMP** : Bone Morphogenetic Protein  
**BRAF** : V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1  
**C1P** : céramide 1-phosphate  
**C1PP** : céramide 1-phosphate phosphatase  
**CAF** : Cancer-associated Fibroblast  
**CDase** : céramidase  
**CDK 4/6** : Cyclin-Dependent Kinase 4/6  
**CDKN2A** : Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A  
**CERT** : Ceramide Transfert protein  
**CK** : céramide kinase  
**cKIT** : tyrosine-protein kinase Kit  
**COX-2** : cyclooxygenase-2  
**CRS** : cérébrosidase  
**CS** : céramide synthase  
**CSF** : Colony-Stimulating Factor  
**CTGF** : Connective Tissue Growth Factor  
**CTLA4** : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4  
**DAG** : Diacyl Glycerol  
**DCT** : Dopachrome tautomerase  
**DES** : dihydrocéramide désaturase  
**DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
**DMS** : N,N Diméthyl Sphingosine  
**DMSO** : Diméthyl-sulfoxyde  
**DRE** : Distal Regulator Element  
**DTIC** : Dimethyl-Triazeno-Imidazole-Carboxamide  
**EDNBR** : Endothelin Receptor type B  
**EDG** : Endothelial Differentiation Gene  
**EDTA** : Ethylène Diamine Tétra Acétique  
**EGF** : Epithelial Growth Factor  
**EMT** : Epithelial-Mesenchymal Transition

**EndMT** : Endothelial -to-mesenchymal transition  
**ER** : Oestrogen Receptor  
**ERK** : Extracellular signal-Regulated Kinases  
**ET3** : Endothelin 3  
**FAP** : Fibroblast-Activation Protein  
**FasL** : Fas-ligand  
**FDA** : Food and Drug Administration  
**FGF** : Fibroblast Growth Factor  
**FGFR** : Fibroblast Growth Factor Receptor  
**FSP** : Fibroblast Specific Protein  
**GalCer** : galactosylcéramide  
**GALC** : galactosylcéramidase  
**GALT** : galactosyltransférase  
**GCS** : glucosylcéramide synthase  
**GlcCer** : glucosylcéramide  
**GM-CSF** : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor 8  
**GRB2** : Growth factor receptor-bound protein 2  
**GRM1** : Glutamate Receptor Metabotropic 1  
**GSK3- $\beta$**  : Glycogen synthase kinase 3 beta  
**GSLs** : glucosylsphingolipides  
**HDAC** : Histone Deacetylase  
**HDGF** : Hepatoma-Derived Growth Factor  
**HDM2** : Human MDM2  
**HEK** : Human Embryonic Kidney  
**HGF (/SF)** : Hepatocyte Growth Factor (/Scatter Factor)  
**HIF** : Hypoxia Inducible Factor  
**HRAS** : Harvey rat sarcoma virus oncogene  
**IAM** : intercellular adhesion molecule  
**Ig** : Immunoglobulines  
**IGF** : Insulin-like Growth Factor  
**I $\kappa$ B** : Inhibitor of  $\kappa$ B protein  
**IKK** : Inhibitor of  $\kappa$ B protein kinase  
**IL** : Interleukine  
**kDa** : kilo Dalton  
**KO** : Knock-Out  
**LPA** : Lysophosphatidic Acid  
**LPP** : Lipid-Phosphate Phosphatase  
**LPS** : Lipopolysaccharide  
**LMM** : Lentigo Malignant Melanoma  
**LN** : Lymph Node  
**LSL - KRAS** : loxP-stop-loxP activatable oncogenic K-Ras  
**MAPK** : Mitogen-Activated Protein Kinase  
**Mcl-1** : Myeloid cell leukemia sequence 1  
**MC1R** : MelanoCortin 1 Receptor  
**MDM2** : Murine Double Minute 2 oncogene  
**MDR** : MultiDrug Resistance  
**MEC** : Matrice Extracellulaire  
**MEK** : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase  
**Mel-CAM** : Melanoma Cell Adhesion Molecule  
**MET** : MNNG HOS Transforming gene , récepteur tyrosine kinase au HGF  
**mGluR5** : metabotropic glutamate receptor 5  
**MIP2** : Macrophage Inflammatory Protein 2

**MITF** :Microphthalmia-associated Transcription Factor  
**MMP** : Matrix Metalloproteinase  
**MT** : Metallothionein  
**MT1-MMP** : Membrane Type 1 Metalloproteinase  
**mTOR** : mammalian Target Of Rapamycin  
**MYC** : myelocytomatosis  
**NFκB** : Nuclear Factor Kappa B  
**NGF** : Nerve Growth Factor  
**NK** : Natural Killer  
**NLS** : Nuclear Localization Sequence  
**NMM** : Nodular Malignant Melanoma  
**NOD/SCID** : Nonobese Diabete/Severe Combined Immunodeficiency  
**NRAS** : Neuroblastome Ras oncogene  
**PA** : Phosphatidic Acid  
**PAI** : Plasminogen Activator Inhibitor  
**PAX3** : paired box 3  
**PBS** : Phosphate Buffered Saline  
**PC** : phosphatidylcholine  
**PCR** : Polymerase chain Reaction  
**PDGF**: Platelet Derived Growth Factor  
**PDGFR**: PDGF Receptor  
**PECAM** : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule  
**PGE2** : Prostaglandine E2  
**PIP3**: Phosphatidyl-Inositol Tri Phosphate  
**PI3K**: Phosphoinositide 3-kinase  
**PKB**: Phosphokinase B ou AKT  
**PKC** : Protein Kinase C  
**PKD** : Protein Kinase D  
**PLC**: Phospholipase C  
**PLD**: Phospholipase D  
**PMA** : Phorbol 12-myristate 13-acétate  
**PMSF** : Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride  
**PP2A** : Protein Phosphatase 2A  
**PREX1** : Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 1  
**PS** : Phosphatidylserine  
**PTEN** : Phosphatase and Tensin Homolog  
**PTX** : Pertussis Toxin  
**RAF** : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma  
**RAS** : Rat Sarcoma  
**Rb** : Rétinoblastome  
**RE** : Réticulum endoplasmique  
**RET** : Rearranged during Transfection  
**RGP** : Radial Growth Phase  
**ROCK** : Rho-associated protein kinase  
**ROS** : Reactive oxygen species  
**RPMI** : Roswell Park Memorial Institute Medium  
**RR** : Risque relatif  
**RT-QPCR** : Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction  
**S1P** : Sphingosine 1-Phosphate  
**S1PR** : Sphingosine 1-Phosphate Receptor  
**SCF** : Steel/Stem cell factor  
**SDS-PAGE** : Electrophorèse en Gel de PolyAcrylamide Sulfate Dodécylque de Sodium

**siRNA** : small interfering Ribonucleic Acid  
**SK** : Sphingosine Kinase  
**SKI** : Sphingosine kinase inhibitor  
**SLs** : Sphingolipides  
**SM** : sphingomyéline  
**SMase** : sphingomyélinase  
**SMS** : sphingomyéline synthase  
**SPL** : Sphingosine 1-phosphate Lyase  
**SPP** : Sphingosine 1-Phosphate Phosphatase  
**SPT** : sérine palmitoyl transférase  
**SSM** : Superficial Spreading Melanoma  
**SV40** : Simian virus 40  
**SVF** : Sérum de Veau Foetal  
**TBS** : Tris Buffered Saline  
**TGF- $\beta$**  : Transforming Growth Factor beta  
**THI** : 2-acétyl-4-tétrahydroxybutylimidazole  
**THY1** : Thy-1 cell surface antigen  
**TIMP** : Tissue Inhibitor of Metalloproteinase  
**TNF $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor alpha  
**TP53** : Tumor Protein 53  
**TPA** : 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate  
**TRAF2** : TNF Receptor-Associated Factor-2/VEGF Vascular Endothelial Growth Factor  
**TRAIL** : TNF-related apoptosis-inducing ligand  
**TRP** : Tyrosinase Related Protein  
**TVA** : Tumor Virus A  
**TYR** : Tyrosinase  
**Tyrp1** : Tyrosinase-related protein 1  
**uPA** : urokinase Plasminogen Activator  
**UV** : Ultra-Violet  
**VCAM** : Vascular Cell Adhesion Molecule  
**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor  
**VGP** : Vertical Growth Phase  
**XPC** : Xeroderma Pigmentosum, complementation group C

## LISTE DES PUBLICATIONS

**Albinet V, Bats ML, Huwiler A, Rochaix P, Chevreau C, Ségui B, Levade T, Andrieu-Abdie N.** Sphingosine kinase 1 promotes melanoma progression by inducing stromagenesis. *Soumis*.

**Albinet V, Bats ML, Bedia C, Sabourdy F, Garcia V, Ségui B, Andrieu-Abadie N, Hornemann T, Levade T.** Genetic disorders of simple sphingolipid metabolism. Livre "Sphingolipids in health and disease" édité par Petrache et Gulbins, *en révision*.

**Sorli SC, Colié S, Albinet V, Bedia C, Carpentier S, Ségui B, Guilbaud N, Levade T, Andrieu-Abadie N.** Non-lysosomal beta-glucosidase GBA2 as a novel source of glucosylceramide catabolism involved in the regulation of melanoma growth. *FASEB*.

**Colié S, Van Veldhoven PP, Kedjouar B, Bedia C, Albinet V, Sorli SC, Garcia V, Djavaheiri-Mergny M, Bauvy C, Codogno P, Levade T, Andrieu-Abadie N.** Disruption of sphingosine 1-phosphate lyase confers resistance to chemotherapy and promotes oncogenesis through Bcl-2/Bcl-xL upregulation. *Cancer Res*. 2009 Dec 15;69(24):9346-53.

**Autefage H, Albinet V, Garcia V, Berges H, Nicolau ML, Therville N, Altié MF, Caillaud C, Levade T, Andrieu-Abadie N.** Lysosomal serine protease CLN2 regulates tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis in a Bid-dependent manner. *J Biol Chem*. 2009 Apr 24;284(17):11507-16.





**CHAPITRE DE LIVRE :**

**Genetic disorders of simple sphingolipid metabolism.**

## Genetic disorders of simple sphingolipid metabolism

Virginie Albinet<sup>1,2</sup>, Marie-Lise Bats<sup>1,2,3</sup>, Carmen Bedia<sup>1,2,\*</sup>, Frédérique Sabourdy<sup>1,2,3</sup>,  
Virginie Garcia<sup>1,2</sup>, Bruno Ségui<sup>1,2</sup>, Nathalie Andrieu-Abadie<sup>1,2</sup>, Thorsten Hornemann<sup>4</sup> and  
Thierry Levade<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR1037, <sup>2</sup> Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Université de Toulouse, <sup>3</sup> Laboratoire de Biochimie Métabolique, Institut Fédératif de Biologie, CHU Purpan, Toulouse, France, and <sup>4</sup> Institute for Clinical Chemistry, University Hospital Zurich and Center for Integrative Human Physiology, University of Zurich, Zurich, Switzerland.

\* Present address: CSIC, Barcelona, Spain.

### Co-corresponding authors:

Thorsten Hornemann, PhD

Institute for Clinical Chemistry, University Hospital Zurich and Center for Integrative Human Physiology, University of Zurich, Zurich, Switzerland

Fax : +41 44 255 4590

E-mail : [thorsten.hornemann@usz.ch](mailto:thorsten.hornemann@usz.ch)

Thierry Levade, MD, PhD

INSERM UMR1037, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Team n°4, CHU Rangueil, BP 84225, 31432 Toulouse cedex 4 (France)

Fax. (33) 5 61 32 20 84

E-mail: [thierry.levade@inserm.fr](mailto:thierry.levade@inserm.fr)

**Running title:** Genetic disorders of simple sphingolipid metabolism

**Table of contents:**

1. Introduction
2. Defects in the biosynthesis of simple sphingolipids
  - 2.1. Serine-palmitoyltransferases
  - 2.2. Ketosphinganine reductase
  - 2.3. Ceramide synthases
  - 2.4. Dihydroceramide desaturase
3. Defects in the degradation of simple sphingolipids
  - 3.1. Ceramidases
  - 3.2. Sphingosine kinases
  - 3.3. Sphingosine 1-phosphate lyase
4. Defects in transport or trafficking of simple sphingolipids
  - 4.1. CERT
  - 4.2. NPC1
5. Concluding remarks
6. Acknowledgements
7. References

**Abbreviations:** CDase, ceramidase; 1-deoxySa, 1-deoxy-sphinganine; 1-deoxymetSa, 1-deoxymethyl-sphinganine; 1-deoxySL, 1-deoxy-sphingolipid; FD, Farber disease; HSAN1, hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1; S1P, sphingosine 1-phosphate; SK, sphingosine kinase; SL, sphingolipid; SM, sphingomyelin; SPL, S1P lyase; SPT, serine-palmitoyltransferase.

## 1. Introduction

Since the identification in the mid sixties of the enzymatic deficiency underlying Gaucher disease, the most prevalent lysosomal storage disease in humans (Brady et al., 1965), a number of genetic defects affecting sphingolipid (SL) metabolism have been identified. Such inherited disorders are for the vast majority autosomal recessive traits and involve the degradation of SLs. However, much more recently genetic disorders of SL biosynthesis and trafficking have also been identified. In addition, quite numerous animal models harboring a genetic defect in SL metabolism have been described. These include both spontaneous and engineered mutant animals of various species.

This review will focus on genetic defects in mammals (mostly humans and mice) and to those that affect the metabolism of simple SLs (i.e., those with a simple substituant at the sphingoid base C1, such as hydrogen or phosphate), whose major pathways in mammalian cells are depicted in Figure 1. Genetic defects of SL metabolism in yeast (Coward and Obeid, 2007; Dickson, 2008), drosophila (Rao and Acharya, 2008; Kraut, 2011) and plants (Pata et al., 2010) have recently been reviewed. In addition, review articles on the genetic deficiencies of glycosphingolipid metabolism (mostly degradation) in humans and mice have recently been published (Sabourdy et al., 2008; Schulze et al., 2009; Wennekes et al., 2009; Xu et al., 2010).

Except for one disease, i.e., *SPTLC* mutations, all these disorders are due to a loss of function. In general, two classifications for such genetic defects can be considered. First, according to the nature of the metabolic pathway, defects in biosynthesis, catabolism or transport can be distinguished. A second classification, based on the nature of the metabolic abnormality, will distinguish defects characterized by i) insufficient production of one or more SL (for instance, defects in 3-ketosphinganine reductase, ceramide synthase or dihydroceramide desaturase), ii) accumulation of one or more undegraded SL (for instance, ceramidase deficiency), iii) abnormal trafficking (such as defects in CERT and NPC1), and iv) production of an abnormal/toxic metabolite (for example, *SPTLC* mutations). Since for some genetic diseases or conditions presented here the

pathogenesis is still unclear, the first mode of classification has been selected.

## 2. Defects in the biosynthesis of simple sphingolipids

### 2.1. Serine-palmitoyltransferases

Serine-palmitoyltransferase (SPT, [EC 2.3.1.50]) catalyzes the first and rate-limiting step in the cellular *de novo* synthesis of SLs, which is the pyridoxal phosphate-dependent condensation of L-serine and palmitoyl-CoA (Figure 1). SPT is a heteromeric enzyme composed of the three subunits SPTLC1 (55 kDa), SPTLC2 (65 kDa) and SPTLC3 (63 kDa). SPTLC1 and SPTLC2 are ubiquitously expressed whereas SPTLC3 shows a more tissue-specific distribution with high expression levels in placenta and heart. SPTLC2 and SPTLC3 share about 70% homology, including the presence of a pyridoxal phosphate binding motif which is absent in SPTLC1. The active SPT complex has a molecular weight of 450-480 kDa and was suggested to be an octamer composed of four SPTLC1-SPTLC2 or SPTLC1-SPTLC3 dimers (Hornemann et al., 2007). However, additional putative regulatory components of the SPT complex have been reported recently (Han et al., 2009; Breslow et al., 2010). Functional studies revealed that SPTLC2 and SPTLC3 exhibit differences in respect to their substrate specificity. SPTLC2 primarily metabolizes palmitoyl (C<sub>16</sub>)-CoAs whereas SPTLC3 has a higher activity towards shorter acyl-CoAs, such as lauroyl (C<sub>12</sub>)- and myristoyl (C<sub>14</sub>)-CoA.

SPT is essential for development, since homozygosity for SPT deficiency in mice is embryonically lethal. Heterozygous *Sptlc1* and *Sptlc2* knockout mice are viable and show a reduced *in vitro* SPT activity but no reduction in plasma sphingomyelin (SM), total cholesterol, phospholipids or liver SM levels (Hojjati et al., 2005). However, *Sptlc1*<sup>+/-</sup> mice show a reduced intestinal cholesterol absorption (Li, Park, et al., 2009) whereas *Sptlc2*<sup>+/-</sup> mice have increased insulin sensitivity (Li et al., 2011). Liver-specific *Sptlc2*<sup>-/-</sup> mice show decreased plasma SM levels and increased hepatic apoE secretion (Li, Li, et al., 2009).

Various missense mutations in the human *SPTLC1* and *SPTLC2* genes are causing the hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1 (HSAN1, OMIM#162400) (Bejaoui et al., 2001; Dawkins et al., 2001; Verhoeven et al., 2004) (see Table 1). Thus far, no mutation in the *SPTLC3* subunit has been associated with HSAN1 (Rotthier et al., 2010). HSAN1 is a rare, autosomal and dominant inherited axonal neuropathy with a progressive loss of pain and temperature sensation. Sense for vibration and joint position is preserved. First symptoms start usually in the lower limbs and then progress further to the upper extremities (Houlden et al., 2006). There are frequent positive sensory symptoms of severe shooting or burning pain in the limbs and an early but transient period of allodynia in some patients. Due to profound sensory impairments, many affected individuals develop neuropathic ulcers and Charcot joints requiring amputation. This distinguishes HSAN1 from other dominantly inherited sensory neuropathies such as Charcot-Marie-Tooth type 2. There is also prominent and often early motor involvement in most patients. Autopsy reports from HSAN1 patients show pronounced degeneration of dorsal root ganglion cells with depletion of myelinated axons in peripheral nerves. Loss of unmyelinated axons is present, but reported to be less severe (Denny-Brown, 1951; Reimann et al., 1958; Houlden et al., 2006; Lindahl et al., 2006). To date, six mutations in the *SPTLC1* (C133W, C133Y, C133R, V144D, S331F and A352V) and four mutations in the *SPTLC2* (V359M, G382V, T409M and I505F) genes were convincingly associated with HSAN1. However, not all reported SPT mutations are causing the disease. The G387A mutation (Verhoeven et al., 2004) appears to be a benign variant not associated with HSAN1 (Hornemann et al., 2009).

*In vitro* enzyme activity of the mutant SPT is generally reduced. This was shown in various mutant overexpressing cell lines including transformed lymphocytes from HSAN1 patients (Bejaoui et al., 2002; Gable et al., 2002; Dedov et al., 2004). However, total SL levels were not altered in plasma of HSAN1 patients indicating that haplo-insufficiency is not at the base of HSAN1. This was further confirmed in a transgenic mouse model for HSAN1. Mice expressing the *SPTLC1*<sup>C133W</sup> mutation develop an age-dependent peripheral neuropathy with motor and sensory impairments. Although *in vitro* SPT activity

is reduced in these mice, the total plasma SL levels are not decreased (McCampbell et al., 2005). A reduced *in vitro* SPT activity is also seen in heterozygous *Sptlc1* and *Sptlc2* knockout mice which do not develop neuropathic symptoms (Hojjati et al., 2005), indicating that HSAN1 is not directly caused by haplo-insufficiency. Therefore, the reduction in SPT activity is not a sufficient explanation for the pathogenesis of HSAN1.

In this context, it was shown recently that SPT does not strictly depend on serine as a substrate but can also metabolize alanine and glycine to a certain extent (Zitomer et al., 2009). This leads to the formation of a novel class of 1-deoxysphingolipids (1-deoxySLs). The use of alanine and glycine instead of serine results in the formation of the two atypical sphingoid bases 1-deoxy-sphinganine (1-deoxySa) and 1-deoxymethyl-sphinganine (1-deoxymetSa), respectively. Both products lack the C<sub>1</sub> hydroxyl group of regular sphingoid bases and hence cannot be converted into complex SLs (e.g., phospho- and glycosphingolipids) nor degraded by the classical pathway which requires the formation of sphingosine 1-phosphate as a catabolic intermediate (Menaldino et al., 2003). The promiscuous activity of SPT is greatly increased in case of the HSAN1 mutants resulting in highly elevated 1-deoxySL levels (Penno et al., 2010). This was demonstrated not only in HSAN1 mutant overexpressing HEK293 cells, but also in transformed lymphocytes and plasma from HSAN1 patients. Significantly elevated 1-deoxySL levels were also seen in plasma and tissues of the SPTLC1<sup>C133W</sup> transgenic mice (Eichler et al., 2009). In contrast, double transgenic mice which concomitantly overexpressed the SPTLC1<sup>C133W</sup> mutant in conjunction with the wild type SPTLC1 showed only marginally elevated 1-deoxySL levels and did not develop neurological symptoms (Eichler et al., 2009). Highly elevated 1-deoxySL levels were primarily detected in the sciatic nerves of HSAN1 mice, but not in the CNS or spinal cord. This fully corresponds to the pattern of pathology in HSAN1 patients who do not exhibit any mental impairment. Moderately elevated 1-deoxySL levels were also found in testes and to a lower extent in liver of these transgenic mice. The 1-deoxySL levels in testes correlated with a low sperm count and a significantly reduced fertility in the transgenic mice (Eichler et al., 2009). The neurotoxicity of 1-deoxySLs was confirmed *in vitro* on cultured dorsal

root ganglion neurons which showed a dose-dependent reduction of neurite length, number and branching in the presence of 1-deoxy-sphingoid bases. This neurotoxic effect was more pronounced for 1-deoxySa than for 1-deoxymetSa (Penno et al., 2010).

Interestingly, the formation of 1-deoxy-sphingoid bases could be specifically modulated by the presence of certain amino acids. The addition of alanine or glycine to the culture medium of SPTLC1<sup>C133W</sup> mutant HEK293 cells led to a significant increase of 1-deoxySa and 1-deoxymetSa formation whereas the addition of D-amino acids like D-alanine and D-serine markedly decreased 1-deoxySL formation. In particular, the addition of the canonical substrate L-serine led to a significantly suppressed formation of 1-deoxySLs, whereas in parallel the formation of sphinganine was stimulated (Garofalo et al., 2011). Thus, L-serine showed a corrective effect on both HSAN1 phenotypes - the reduced sphinganine generation and the increased formation of neurotoxic 1-deoxySLs.

The benefit of L-serine supplementation was further explored in the HSAN1 mouse model. Mice receiving an L-serine-enriched diet (10% w/w) showed a significant decrease of plasma 1-deoxySL levels within 4-5 days, and these levels remained low over the whole feeding period. As a consequence, L-serine-fed HSAN1 mice did not develop neurological symptoms whereas age-matched, but normally fed SPTLC1<sup>C133W</sup> mice developed severe neuronal deficits after 6-9 months. In contrast, supplementation with L-alanine (10% w/w) led to significantly increased 1-deoxySL plasma levels allied with the development of severe neurological deficits in the mice already at an age of 2-3 months.

The beneficial effect of oral L-serine supplementation was furthermore confirmed in a 10-week pilot study with HSAN1 patients. Proband received a total dose of 200 or 400 mg L-serine/kg/day divided in three portions. In both groups, L-serine supplementation resulted in a significant reduction of plasma 1-deoxySL levels reaching normal levels after 5-6 weeks (Garofalo et al., 2011). After termination of the 10-week trial, 1-deoxySL plasma levels started to increase. Improvement in neurological symptoms was not examined and also not expected within the short time frame of this study. However, some



patients reported an increase in sensation (hand tingling, increased menstrual cramps), improvements in skin robustness and wound healing, as well as faster nail and body hair growth. Based on these results, a simple and inexpensive oral L-serine supplementation might be a perspective for a future therapy in HSAN1.

## **2.2. Ketosphinganine reductase**

Only one condition has been described that leads to markedly reduced activity of the 3-ketosphinganine reductase, which is characterized by a point mutation discovered in cattle, believed to cause autosomal recessive neurodegenerative disease spinal muscular atrophy (Krebs et al., 2007). Whereas SL levels have not been determined in the tissues of the affected calves, this observation would emphasize the vulnerability of (bovine) neuronal cells to either the substrate or products of 3-ketosphinganine reductase. Nevertheless, a subsequent study indicated that mutations in the 3-ketosphinganine reductase do not appear to account for spinal muscular atrophy in humans (Parkinson et al., 2008).

## **2.3. Ceramide synthases**

So far, six mammalian genes encoding *bona fide* ceramide synthases have been characterized (Levy and Futerman, 2010). While no human disease has been reported so far to be caused by mutations in the *CERS* genes, spontaneous or engineered defects in the corresponding mouse genes have been recently described (Table 1). In line with the predominant expression of *Cers1* in brain, mutations in the *Cers1* coding region result in an ataxic phenotype in mice. On the other hand, disruption of *Cers2* leads both to a hepatopathy that partially resembles that induced by fumonisin B1, a fungal inhibitor of ceramide synthase, and an encephalopathy (see Table 1).

In these mouse models, the lipid molecules acting as a culprit in the disease pathogenesis remain to be identified. Nevertheless, studies of these defects have led to

the following conclusions. First, there is no metabolic redundancy between *Cers1* or *Cers2* and other ceramide synthases; at best, the decreased content of some ceramide species due to a defective synthase isoform is compensated by an elevation of other ceramide species. These observations also corroborate the previously reported substrate specificity of this family of enzymes. Second, *Cers1* and *Cers2* play key distinct tissue-specific functions that are likely ascribed to specific (or very restricted) molecular ceramide species in a given cell type or organ. Third, the substrate (chiefly, sphinganine) and/or lipid products of *Cers1* and *Cers2* play critical roles in liver and brain disease development. Whether similar conclusions hold true in other mammals and whether comparable diseases in humans are caused by *CERS* defects is still unknown.

#### **2.4. Dihydroceramide desaturase**

Two genes in mammals (*DEGS1* and *DEGS2*) are involved in the introduction of a double bond in the sphingoid moiety to produce ceramides. So far, only ablation of the *Degs1* gene in mice has been described (Holland et al., 2007). Rather simple analyses of SL levels in different organs of this animal model indicated that the *Degs1* gene product plays a major role in desaturating dihydroceramide. While homozygous null mice display a complex phenotype that deserves further attention, heterozygous animals were refractory to glucocorticoid-induced insulin resistance, which led the authors to conclude about the critical function of ceramide in glucose homeostasis and the development of insulin resistance.

### **3. Defects in the degradation of simple sphingolipids**

#### **3.1. Ceramidases**

Ceramidases (CDases) are the enzymes that catalyze the hydrolysis of ceramides to form sphingosine and free fatty acids. According to their pH optima of activity, they have been classified into acid, neutral and alkaline forms. Five human CDases encoded by five

distinct genes have been identified: an acid CDase (*ASAH1*), a neutral CDase (*ASAH2*), and three alkaline CDases (*ACER1/ASAH3*, *ACER2/ASAH3L* and *ACER3/APHC*) (Mao and Obeid, 2008).

Acid CDase is a ubiquitous lysosomal enzyme whose genetic deficiency causes Farber disease (FD, OMIM#228000), also called lipogranulomatosis (Levade et al., 2009). FD is a rare inherited lipid storage disorder characterized by accumulation of ceramide in cells and tissues of patients. Clinically, FD patients show deformed and painful joints, subcutaneous granulomas, hoarseness due to laryngeal involvement, and premature cell death (see Table 2). Also, patients may present hepatosplenomegaly and nervous system dysfunction (Levade et al., 2009). Currently, besides palliative care, there is no treatment for FD. Bone marrow or hematopoietic stem cell transplantations have been performed in a few trials in patients without neurological involvement. As a result, only partial resolution of the peripheral symptoms has occurred (Vormoor et al., 2004; Ehler et al., 2006). Recently, a preclinical gene therapy study for FD has been carried out employing a lentiviral vector coding for acid CDase (Walia et al., 2011). This vector was used for transduction and transplantation of primary hematopoietic cells in three enzymatically normal non-human primates. An increase of acid CDase activity and a reduction of ceramide levels in peripheral blood and bone marrow cells, spleen and liver throughout a one-year study period were observed, without compromising the health status of the animals. This therapeutic approach appears as a promising strategy for the treatment of FD and other monogenic defects in future clinical gene therapy trials.

Li *et al.* have disrupted the mouse gene *Asah1* in embryonic stem cells by insertional mutagenesis to investigate the role of acid CDase in mammalian development (Li et al., 2002; Eliyahu et al., 2007). Homozygosity for *Asah1* disruption resulted in very early embryonic lethality suggesting that acid CDase activity is essential for embryo development. The heterozygous *Asah1*<sup>+/-</sup> mice survived, but quite intriguingly showed evidence of a progressive lipid storage disease in their organs.

Neutral CDase, encoded by the *ASAH2* gene, is highly expressed in the small intestine along the brush border, where it is involved in the catabolism of dietary SLs. Kono *et al.* generated neutral CDase-null mice that were viable, healthy and fertile, with no apparent gross abnormalities (Kono *et al.*, 2006). This was possibly due to the control of ceramide levels by other CDases, such as the acid or alkaline forms. However, increased concentrations of C16-ceramide were observed in intestine and feces, suggesting that neutral CDase is important for the digestion of dietary ceramides. In contrast, Yoshimura *et al.* (Yoshimura *et al.*, 2004) observed that the knockdown of nCDase in zebrafish increased the number of subjects with severe morphological and cellular abnormalities. This indicated that in zebrafish and possibly other vertebrates, neutral CDase is essential for early development (Yoshimura *et al.*, 2004).

With respect to the alkaline CDases, no genetic deficiency or knockout studies in animals have been reported to date.

### **3.2. Sphingosine kinases**

Sphingosine kinases (SK) catalyze the synthesis of sphingosine 1-phosphate (S1P) via the phosphorylation of sphingoid bases. Two isoforms of mammalian SKs (termed 1 and 2), encoded by *SPHK1* and *SPHK2* genes, have been cloned and characterized (Kohama *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000). SK1 localizes predominantly in the cytoplasm but upon stimulation can relocate to the inner leaflet of the plasma membrane. Interestingly, in endothelial cells SK1 is secreted and able to produce S1P extracellularly (Ancellin *et al.*, 2002). Although SK1 and SK2 are expressed in numerous tissues, they show a distinct tissue distribution and developmental expression pattern (Liu *et al.*, 2000; Fukuda *et al.*, 2003). Indeed, while SK1 is predominantly expressed in lung, spleen and thymus, SK2 is highly expressed in liver, heart and kidney. In order to better understand the role of SK in mammalian development, deficient mouse models have been generated and characterized. Homozygosity for disruption of a single SK isoform leads to viable mice that are fertile and display no obvious dysfunctions (Allende *et al.*, 2004). Interestingly,

*Sphk1*<sup>-/-</sup> mice have reduced S1P levels in serum but not in tissues. Otherwise, S1P levels in *Sphk2*<sup>-/-</sup> mice differ depending on the model described. Whereas one model, produced on a 129/Sv x C57BL/6 mixed background, exhibited a 25% reduction of plasma S1P levels (Kharel et al., 2005), another on Balb/c mice did not show a decrease but rather an increase as compared to wild-type animals (Zemann et al., 2006). In sharp contrast, *Sphk1*<sup>-/-</sup> *Sphk2*<sup>-/-</sup> double knockout mice, which exhibit strongly reduced levels of S1P, die at E13.5 due to severe defects in neurogenesis and angiogenesis (Mizugishi et al., 2007). However, the conditional *Sphk1*<sup>-/-</sup> *Sphk2*<sup>-/-</sup> double knockout mouse model generated by Pappu et al. (in which SK expression is abolished at postnatal day 5 in hematopoietic and endothelial cells) was viable and showed that plasma S1P is mainly hematopoietic in origin.

Up to now, no mutation in the *SPHK* genes has been described in human disease. Nevertheless, SK and S1P are viewed as critical players in several pathological states, such as anaphylaxis, inflammation, cancer, diabetes or atherosclerosis (Fyrst and Saba, 2010).

### 3.3. Sphingosine 1-phosphate lyase

S1P lyase (SPL) is a pyridoxal 5'-phosphate-dependent aldehyde-lyase that irreversibly degrades S1P to phosphoethanolamine and hexadecenal in the final step of SL catabolism (Bandhuvula and Saba, 2007). By regulating intracellular S1P levels, SPL participates to the so-called "sphingolipid rheostat" and has the ability to shift the balance towards cell death. While no mutation of the *SGPL1* gene has been reported so far to cause human disease, its expression appears to be altered in some cancers; SPL also plays a critical role in regulating immune functions. Indeed, SPL expression and activity were found to be downregulated in human colon cancer tissues and in adenomatous lesions of the *APC*<sup>Min/+</sup> mouse model of intestinal tumorigenesis compared to normal adjacent tissues (Oskouian et al., 2006). SPL expression has also been shown to be

downregulated in human melanoma cell lines compared to normal melanocytes (Colié et al., 2009).

To further investigate the role of SPL in development, knockout and humanized mouse models have been recently created. Homozygous *Sgpl1* knockout mice die within 8 weeks after birth and exhibit significant growth failure, vascular abnormalities, anemia, skeletal defects, and renal abnormalities (Schmahl et al., 2007). Beyond the reduced lifespan, SPL-deficient mice also display lesions in lungs, heart, urinary tract and bone, and develop myeloid cell hyperplasia. Lymphopenia due to alterations in lymphocyte development and egress from the thymus and secondary lymphoid organs has also been reported (Vogel et al., 2009). This phenotype is reminiscent of that caused by FTY720 (Mandala et al., 2002); in addition, the apoptosis observed in thymus might be mediated by increased levels of ceramide in this tissue (Weber et al., 2009). The humanized knock-in mice generated by the insertion of the human *SGPL1* cDNA in the *Sgpl1* null background resulted in SPL expression at 10–20% of normal mouse SPL levels, yet failed to restore normal T-cell development and trafficking (Vogel et al., 2009). In summary, these animal models indicate that the absence of SPL leads to significant developmental and functional defects. However, whether *SGPL1* mutations are compatible with life and/or are responsible for human disease remains to be determined.

#### **4. Defects in transport or trafficking of simple sphingolipids**

##### **4.1. Ceramide transporter (CERT)**

CERT is a cytosolic protein that mediates the ATP-dependent ER-to-Golgi transfer of ceramide in a non-vesicular manner. Human CERT is encoded by the *COL4A3BP* gene which was initially isolated in 1999 as the gene for Goodpasture antigen-Binding Protein (GPBP) (Raya et al., 1999). Goodpasture's syndrome is a strictly human disorder caused by antibodies directed against the non-collagenous domain of the  $\alpha$ 3-chain of type IV collagen. In 2003, Hanada and coworkers showed that a spliced variant of GPBP which lacks a serine-rich domain composed of 26 amino acids was responsible for the cytosolic

trafficking of ceramide from the ER to the Golgi apparatus (Hanada et al., 2003). GPBPs are phylogenetically highly conserved during evolution between lower vertebrates and mammals at the amino acid level.

CERT was identified in the Chinese Hamster Ovary LY-A cell line that displays a severe defect in the synthesis of sphingomyelin (SM). Its reduced level of SM makes this cell line resistant to lysenin, a cytolytic toxin derived from the earthworm *Eisenia foetida* (Hanada et al., 2003). CERT is a hydrophilic 68 kDa protein which contains three domains :

a) the amino terminal region ( $\approx 120$  aa) forms a pleckstrin homology domain which specifically binds to phosphatidylinositol 4-phosphate, mainly distributed to the Golgi apparatus. In the mutant LY-A cell line, the PH-domain of CERT has one point mutation, G67E, which destroys the phosphoinositide-binding activity, resulting in an impaired ER-to-Golgi ceramide transport (Levine and Munro, 2002; Hanada et al., 2003).

b) the middle region ( $\approx 250$  aa) contains a FFAT (two phenylalanine residues in an acidic tract) motif which interacts with vesicle associated-ER proteins (VAPs A and B) and targets CERT to ER membranes (Kawano et al., 2006).

c) the carboxy terminal region ( $\approx 230$  aa) is a START (steroidogenic acute regulatory protein-related protein transfer) domain which forms a deep lipid-binding pocket that could extract ceramide from membranes and transfer the bound ceramide to other membranes (Kumagai et al., 2005).

Gene disruption of the corresponding *CERT* in mice resulted in death around embryonic day 11.5. Cells of the mutant embryos (analysed at E10.5) showed a 60% reduction in the total SM content and a 2-fold increase in the ceramide content of the ER as compared to wild-type controls, leading to an abnormal dilation of the ER and degenerating mitochondria, probably affecting organogenesis (Wang et al., 2009). Whether mutations in the *COL4A3BP* gene cause developmental (or other) defects in humans has never been reported.

## 4.2. Niemann-Pick C1 (NPC1)

NPC1 is a 13 trans-membrane domains glycoprotein mainly residing in late endosomes (Higgins et al., 1999; Davies and Ioannou, 2000). The gene (*NPC1*) that encodes this protein is located on chromosome 18q11-q12 (Greer et al., 1997). The exact role of NPC1 is still unclear but mutations in *NPC1* are responsible for a genetic disorder called Niemann-Pick disease type C (MIM #257220) (Carstea et al., 1997). About 5% of patients affected with this disease carry mutations in the *NPC2* gene, encoding a soluble lysosomal protein. Niemann-Pick type C is an autosomal recessive lysosomal storage disorder characterized by the accumulation of a large variety of lipids in late endosomes and lysosomes (Table 3). While unesterified cholesterol and SM accumulate in peripheral tissues, brain storage is dominated by GM2 and GM3 gangliosides. Niemann-Pick type C is a neurovisceral disease of variable severity (for a review, see (Vanier, 2010) and (Patterson et al., 2009)). Disease onset (as well as death) can range from the neonatal period to adult age. Progressive neurological impairment occurs in all patients, and may manifest as cerebellar ataxia, dysarthria, dysphagia and/or dementia. Visceral involvement, mainly splenomegaly and hepatomegaly or, more rarely, neonatal cholestasis and respiratory distress, always precedes the neurological disease, but may be absent in some patients.

Two murine, one feline and one canine spontaneous models of Niemann-Pick type C have been reported (Morris et al., 1977; Miyawaki et al., 1982; Lowenthal et al., 1990; Kuwamura et al., 1993), showing clinical and pathological features quite similar to those in humans. Experimental analyses based on both human samples and animal models led to the conclusion that a key function of NPC1 is the transport of unesterified cholesterol out of the acidic compartments (Liscum and Faust, 1989; Infante et al., 2008; Kwon et al., 2009). The exact role of NPC1, however, in the metabolism or trafficking of SLs is still unsolved. Nonetheless, its involvement in the transport of sphingosine has recently been postulated (Lloyd-Evans et al., 2008). Sphingosine is the final product of SL catabolism and is known as a bioactive lipid with pro-apoptotic properties. Previous work showed a



marked increase in the levels of sphingosine in Niemann-Pick type C tissues (Goldin et al., 1992; Rodriguez-Lafrasse et al., 1994). It has recently been proposed that sphingosine might be the first lipid accumulating in late endosomes/lysosomes of Niemann-Pick type C cells. This storage would affect the late endosome/lysosome calcium homeostasis, inducing a global defect in vesicular trafficking and the secondary accumulation, in late endosomes, of cholesterol and SLs (Lloyd-Evans et al., 2008). Niemann-Pick type C can thus be viewed as a genetic disorder of sphingosine metabolism where NPC1 could play the role of the sphingosine transporter. Nevertheless, this view has recently been challenged by a work which showed no specific sequestration of lysosomal sphingosine in NPC1-deficient cells (Blom et al., 2012). While there is currently no effective therapy for this disorder, promising results have been obtained in affected mice and cats using the cholesterol chelators cyclodextrins (Davidson et al., 2009; Liu et al., 2009; Ward et al., 2010).

## **5. Concluding remarks**

A number of alterations in the genes encoding proteins that control the metabolism of simple SLs have already been identified or created. The cell lines derived from the human patients or animals bearing these defects, as well as the corresponding mutant mice, represent unique models for the study of SL metabolism and functions. Analysis of the metabolic and functional consequences of these genetic defects has already produced invaluable insights into the physiological role of SLs. Nevertheless, not only further gene products which remain very poorly studied (such as ketosphinganine reductase, dihydroceramide desaturases, or S1P phosphatases) need to be characterized but also more refinements in manipulation of gene expression can be introduced to generate animal models that help dissect the functions of SLs and, perhaps, replicate reliably various human pathological conditions.

## **6. Acknowledgements**

This work was supported by INSERM, Université Paul Sabatier, ANR (SphingoDR program), RITC, LNCC and the Vaincre les Maladies Lysosomales Foundation (for TL's group), and the Gebert Rűf Foundation, the Center for Integrative Human Physiology (ZIHP, University of Zurich) and the European Commission (LSHM-CT-2006-037631) (for TH's group).

## References

1. Allende ML, Bektas M, Lee BG, Bonifacino E, Kang J, Tuymetova G, Chen W, Saba JD, Proia RL (2011) Sphingosine-1-phosphate lyase deficiency produces a pro-inflammatory response while impairing neutrophil trafficking. *J Biol Chem* 286: 7348–7358.
2. Allende ML, Sasaki T, Kawai H, Olivera A, Mi Y, van Echten-Deckert G, Hajdu R, Rosenbach M, Keohane CA, Mandala S, Spiegel S, Proia RL (2004) Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720. *J Biol Chem* 279: 52487–52492.
3. Ancellin N, Colmont C, Su J, Li Q, Mittereder N, Chae SS, Stefansson S, Liao G, Hla T (2002) Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation. *J Biol Chem* 277: 6667–6675.
4. Bandhuvula P, Saba JD (2007). Sphingosine-1-phosphate lyase in immunity and cancer: silencing the siren. *Trends Mol Med* 13: 210–217.
5. Bejaoui K, Uchida Y, Yasuda S, Ho M, Nishijima M, Brown RH Jr, Holleran WM, Hanada K (2002) Hereditary sensory neuropathy type 1 mutations confer dominant negative effects on serine palmitoyltransferase, critical for sphingolipid synthesis. *J Clin Invest* 110: 1301–1308.
6. Bejaoui K, Wu C, Scheffler MD, Haan G, Ashby P, Wu L, de Jong P, Brown RH Jr (2001) SPTLC1 is mutated in hereditary sensory neuropathy, type 1. *Nat Genet* 27: 261–262.
7. Ben-David O, Pewzner-Jung Y, Brenner O, Laviad EL, Kogot-Levin A, Weissberg I, Biton IE, Pienik R, Wang E, Kelly S, Alroy J, Raas-Rothschild A, Friedman A, Brügger B, Merrill AH Jr, Futerman AH (2011) Encephalopathy caused by ablation of very long acyl chain ceramide synthesis may be largely due to reduced galactosylceramide levels. *J Biol Chem* 286: 30022–30033.
8. Blom T, Li Z, Bittman R, Somerharju P, Ikonen E (2012) Tracking Sphingosine Metabolism and Transport in Sphingolipidoses: NPC1 Deficiency as a Test Case. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 9999.
9. Brady RO, Kanfer JN, Shapiro D (1965) Metabolism of glucocerebrosides. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Gaucher's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 18: 221–225.
10. Breslow DK, Collins SR, Bodenmiller B, Aebersold R, Simons K, Shevchenko A, Ejsing CS, Weissman JS (2010) Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis. *Nature* 463: 1048–1053.
11. Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, Loftus SK, Zhang D, Cummings C, Gu J, Rosenfeld MA, Pavan WJ, Krizman DB, Nagle J, Polymeropoulos MH, Sturley SL, Ioannou YA, Higgins ME, Comly M, Cooney A, Brown A, Kaneski CR, Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Neufeld EB, Chang TY, Liscum L, Strauss JF 3rd, Ohno K, Zeigler M, Carmi R, Sokol J, Markie D, O'Neill RR, van Diggelen OP, Elleder M, Patterson MC, Brady RO, Vanier MT, Pentchev PG, Tagle DA (1997) Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 277: 228–231.
12. Colié S, Van Veldhoven PP, Kedjouar B, Bedia C, Albinet V, Sorli SC, Garcia V, Djavaheri-Mergny M, Bauvy C, Codogno P, Levade T, Andrieu-Abadie N (2009) Disruption of sphingosine 1-phosphate lyase confers resistance to chemotherapy

- and promotes oncogenesis through Bcl-2/Bcl-xL upregulation. *Cancer Res* 69: 9346–9353.
13. Cowart LA, Obeid LM (2007) Yeast sphingolipids: recent developments in understanding biosynthesis, regulation, and function. *Biochim Biophys Acta* 1771: 421–431.
  14. Davidson CD, Ali NF, Micsenyi MC, Stephney G, Renault S, Dobrenis K, Ory DS, Vanier MT, Walkley SU (2009) Chronic cyclodextrin treatment of murine Niemann-Pick C disease ameliorates neuronal cholesterol and glycosphingolipid storage and disease progression. *PLoS ONE* 4: e6951.
  15. Davies JP, Ioannou YA (2000) Topological analysis of Niemann-Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein. *J Biol Chem* 275: 24367–24374.
  16. Dawkins JL, Hulme DJ, Brahmabhatt SB, Auer-Grumbach M, Nicholson GA (2001) Mutations in SPTLC1, encoding serine palmitoyltransferase, long chain base subunit-1, cause hereditary sensory neuropathy type I. *Nat Genet* 27: 309–312.
  17. Dedov VN, Dedova IV, Merrill AH Jr, Nicholson GA (2004) Activity of partially inhibited serine palmitoyltransferase is sufficient for normal sphingolipid metabolism and viability of HSN1 patient cells. *Biochim Biophys Acta* 1688: 168–175.
  18. Denny-Brown D (1951) Hereditary sensory radicular neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 14: 237–252.
  19. Dickson RC (2008) Thematic review series: sphingolipids. New insights into sphingolipid metabolism and function in budding yeast. *J Lipid Res* 49: 909–921.
  20. Ehlert K, Roth J, Frosch M, Fehse N, Zander N, Vormoor J (2006) Farber's disease without central nervous system involvement: bone-marrow transplantation provides a promising new approach. *Ann Rheum Dis* 65: 1665–1666.
  21. Eichler FS, Hornemann T, McCampbell A, Kuljis D, Penno A, Vardeh D, Tamrazian E, Garofalo K, Lee HJ, Kini L, Selig M, Frosch M, Gable K, von Eckardstein A, Woolf CJ, Guan G, Harmon JM, Dunn TM, Brown RH Jr (2009) Overexpression of the wild-type SPT1 subunit lowers desoxysphingolipid levels and rescues the phenotype of HSN1. *J Neurosci* 29: 14646–14651.
  22. Eliyahu E, Park JH, Shtraizent N, He X, Schuchma EH (2007) Acid ceramidase is a novel factor required for early embryo survival. *FASEB J* 21: 1403–1409.
  23. Elrick MJ, Pacheco CD, Yu T, Dadgar N, Shakkottai VG, Ware C, Paulson HL, Lieberman AP (2010) Conditional Niemann-Pick C mice demonstrate cell autonomous Purkinje cell neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 19: 837–847.
  24. Fukuda Y, Kihara A, Igarashi Y (2003) Distribution of sphingosine kinase activity in mouse tissues: contribution of SPHK1. *Biochem Biophys Res Commun* 309: 155–160.
  25. Fyrst H, Saba JD (2010) An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators. *Nat Chem Biol* 6: 489–497.
  26. Gable K, Han G, Monaghan E, Bacikova D, Natarajan M, Williams R, Dunn TM (2002) Mutations in the yeast LCB1 and LCB2 genes, including those corresponding to the hereditary sensory neuropathy type I mutations, dominantly inactivate serine palmitoyltransferase. *J Biol Chem* 277: 10194–10200.
  27. Garofalo K, Penno A, Schmidt BP, Lee HJ, Frosch MP, von Eckardstein A, Brown RH, Hornemann T, Eichler FS (2011) Oral L-serine supplementation reduces

- production of neurotoxic deoxysphingolipids in mice and humans with hereditary sensory autonomic neuropathy type 1. *J Clin Invest* 121: 4735–4745.
28. Goldin E, Roff CF, Miller SP, Rodriguez-Lafrasse C, Vanier MT, Brady RO, Pentchev PG (1992). Type C Niemann-Pick disease: a murine model of the lysosomal cholesterol lipidosis accumulates sphingosine and sphinganine in liver. *Biochim Biophys Acta* 1127: 303–311.
  29. Greer WL, Riddell DC, Byers DM, Welch JP, Girouard GS, Sparrow SM, Gillan TL, Neumann PE (1997) Linkage of Niemann-Pick disease type D to the same region of human chromosome 18 as Niemann-Pick disease type C. *Am J Hum Genet* 61: 139–142.
  30. Han G, Gupta SD, Gable K, Niranjanakumari S, Moitra P, Eichler F, Brown RH Jr, Harmon JM, Dunn TM (2009) Identification of small subunits of mammalian serine palmitoyltransferase that confer distinct acyl-CoA substrate specificities. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 106: 8186–8191.
  31. Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M, Nishijima M (2003) Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 426: 803–809.
  32. Higgins ME, Davies JP, Chen FW, Ioannou YA (1999) Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network. *Mol Genet Metab* 68: 1–13.
  33. Hojjati MR, Li Z, Jiang XC (2005) Serine palmitoyl-CoA transferase (SPT) deficiency and sphingolipid levels in mice. *Biochim Biophys Acta* 1737: 44–51.
  34. Holland WL, Brozinick JT, Wang LP, Hawkins ED, Sargent KM, Liu Y, Narra K, Hoehn KL, Knotts TA, Siesky A, Nelson DH, Karathanasis SK, Fontenot GK, Birnbaum MJ, Summers SA (2007) Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 5: 167–179.
  35. Hornemann T, Penno A, Richard S, Nicholson G, van Dijk FS, Rotthier A, Timmerman V, von Eckardstein A (2009) A systematic comparison of all mutations in hereditary sensory neuropathy type I (HSAN I) reveals that the G387A mutation is not disease associated. *Neurogenetics* 10: 135–143.
  36. Hornemann T, Wei Y, von Eckardstein A (2007) Is the mammalian serine palmitoyltransferase a high-molecular-mass complex? *Biochem J* 405: 157–164.
  37. Houlden H, King R, Blake J, Groves M, Love S, Woodward C, Hammans S, Nicoll J, Lennox G, O'Donovan DG, Gabriel C, Thomas PK, Reilly MM (2006) Clinical, pathological and genetic characterization of hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1 (HSAN I). *Brain* 129: 411–425.
  38. Imgrund S, Hartmann D, Farwanah H, Eckhardt M, Sandhoff R, Degen J, Gieselmann V, Sandhoff K, Willecke K (2009) Adult ceramide synthase 2 (CERS2)-deficient mice exhibit myelin sheath defects, cerebellar degeneration, and hepatocarcinomas. *J Biol Chem* 284: 33549–33560.
  39. Infante RE, Radhakrishnan A, Abi-Mosleh L, Kinch LN, Wang ML, Grishin NV, Goldstein JL, Brown MS (2008) Purified NPC1 protein: II. Localization of sterol binding to a 240-amino acid soluble luminal loop. *J Biol Chem* 283: 1064–1075.
  40. Kawano M, Kumagai K, Nishijima M, Hanada K (2006) Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT. *J Biol Chem* 281: 30279–30288.
  41. Kharel Y, Lee S, Snyder AH, Sheasley-O'Neill SL, Morris MA, Setiady Y, Zhu R, Zigler MA, Burcin TL, Ley K, Tung KSK, Engelhard VH, Macdonald TL, Pearson-

- White S, Lynch KR (2005) Sphingosine kinase 2 is required for modulation of lymphocyte traffic by FTY720. *J Biol Chem* 280: 36865–36872.
42. Kohama T, Olivera A, Edsall L, Nagiec MM, Dickson R, Spiegel S (1998) Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J Biol Chem* 273: 23722–23728.
  43. Kono M, Dreier JL, Ellis JM, Allende ML, Kalkofen DN, Sanders KM, Bielawski J, Bielawska A, Hannun YA, Proia RL (2006) Neutral ceramidase encoded by the *Asah2* gene is essential for the intestinal degradation of sphingolipids. *J Biol Chem* 281: 7324–7331.
  44. Kraut R (2011) Roles of sphingolipids in *Drosophila* development and disease. *J Neurochem* 116: 764–778.
  45. Krebs S, Medugorac I, Röther S, Strässer K, Förster M (2007) A missense mutation in the 3-ketodihydrosphingosine reductase FVT1 as candidate causal mutation for bovine spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 6746–6751.
  46. Kumagai K, Yasuda S, Okemoto K, Nishijima M, Kobayashi S, Hanada K (2005) CERT mediates intermembrane transfer of various molecular species of ceramides. *J Biol Chem* 280: 6488–6495.
  47. Kuwamura M, Awakura T, Shimada A, Umemura T, Kagota K, Kawamura N, Naiki M (1993) Type C Niemann-Pick disease in a boxer dog. *Acta Neuropathol* 85: 345–348.
  48. Kwon HJ, Abi-Mosleh L, Wang ML, Deisenhofer J, Goldstein JL, Brown MS, Infante RE (2009) Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell* 137: 1213–1224.
  49. Levade T, Sandhoff K, Schulze H, Medin JA (2009) Acid Ceramidase Deficiency: Farber Lipogranulomatosis, in: *Scriver's OMMBID (Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease)*. Valle, et al., New York.
  50. Levine TP, Munro S (2002) Targeting of Golgi-specific pleckstrin homology domains involves both PtdIns 4-kinase-dependent and -independent components. *Curr Biol* 12: 695–704.
  51. Levy M, Futerman AH (2010) Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life* 62: 347–356.
  52. Li CM, Park JH, Simonaro CM, He X, Gordon RE, Friedman AH, Ehleiter D, Paris F, Manova K, Hepbildikler S, Fuks Z, Sandhoff K, Kolesnick R, Schuchman EH, Hepbilokler S (2002) Insertional mutagenesis of the mouse acid ceramidase gene leads to early embryonic lethality in homozygotes and progressive lipid storage disease in heterozygotes. *Genomics* 79: 218–224.
  53. Li Z, Li Y, Chakraborty M, Fan Y, Bui HH, Peake DA, Kuo MS, Xiao X, Cao G, Jiang XC (2009) Liver-specific deficiency of serine palmitoyltransferase subunit 2 decreases plasma sphingomyelin and increases apolipoprotein E levels. *J Biol Chem* 284: 27010–27019.
  54. Li Z, Park TS, Li Y, Pan X, Iqbal J, Lu D, Tang W, Yu L, Goldberg IJ, Hussain MM, Jiang XC (2009) Serine palmitoyltransferase (SPT) deficient mice absorb less cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 1791: 297–306.
  55. Li Z, Zhang H, Liu J, Liang CP, Li Y, Li Y, Teitelman G, Beyer T, Bui HH, Peake DA, Zhang Y, Sanders PE, Kuo MS, Park TS, Cao G, Jiang XC (2011) Reducing plasma membrane sphingomyelin increases insulin sensitivity. *Mol Cell Biol* 31: 4205–4218.
  56. Lindahl AJ, Lhatoo SD, Campbell MJ, Nicholson G, Love S (2006) Late-onset hereditary sensory neuropathy type I due to SPTLC1 mutation: autopsy findings. *Clin Neurol Neurosurg* 108: 780–783.

57. Liscum L, Faust JR (1989) The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3-beta-[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one. *J Biol Chem* 264: 11796–11806.
58. Liu B, Turley SD, Burns DK, Miller AM, Repa JJ, Dietschy JM (2009) Reversal of defective lysosomal transport in NPC disease ameliorates liver dysfunction and neurodegeneration in the npc1<sup>-/-</sup> mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 2377–2382.
59. Liu H, Sugiura M, Nava VE, Edsall LC, Kono K, Poulton S, Milstien S, Kohama T, Spiegel S (2000) Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J Biol Chem* 275: 19513–19520.
60. Lloyd-Evans E, Morgan AJ, He X, Smith DA, Elliot-Smith E, Sillence DJ, Churchill GC, Schuchman EH, Galione A, Platt FM (2008) Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat Med* 14: 1247–1255.
61. Lowenthal AC, Cummings JF, Wenger DA, Thrall MA, Wood PA, de Lahunta A (1990) Feline sphingolipidosis resembling Niemann-Pick disease type C. *Acta Neuropathol* 81: 189–197.
62. Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, Thornton R, Shei GJ, Card D, Keohane C, Rosenbach M, Hale J, Lynch CL, Rupprecht K, Parsons W, Rosen H (2002) Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 296: 346–349.
63. Mao C, Obeid LM (2008) Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta* 1781: 424–434.
64. McCampbell A, Truong D, Broom DC, Allchorne A, Gable K, Cutler RG, Mattson MP, Woolf CJ, Frosch MP, Harmon JM, Dunn TM, Brown RH Jr (2005) Mutant SPTLC1 dominantly inhibits serine palmitoyltransferase activity in vivo and confers an age-dependent neuropathy. *Hum Mol Genet* 14: 3507–3521.
65. Menaldino DS, Bushnev A, Sun A, Liotta DC, Symolon H, Desai K, Dillehay DL, Peng Q, Wang E, Allegood J, Trotman-Pruett S, Sullards MC, Merrill AH Jr (2003) Sphingoid bases and de novo ceramide synthesis: enzymes involved, pharmacology and mechanisms of action. *Pharmacol Res* 47: 373–381.
66. Miyawaki S, Mitsuoka S, Sakiyama T, Kitagawa T (1982) Sphingomyelinosis, a new mutation in the mouse: a model of Niemann-Pick disease in humans. *J Hered* 73: 257–263.
67. Mizugishi K, Li C, Olivera A, Bielawski J, Bielawska A, Deng CX, Proia RL (2007) Maternal disturbance in activated sphingolipid metabolism causes pregnancy loss in mice. *J Clin Invest* 117: 2993–3006.
68. Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Miller GF, Spiegel S, Proia RL (2005) Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol* 25: 11113–11121.
69. Morris M, Bhuvaneshwaran C, Boothe A (1977) Tissue cholesterol storage disorder in BALB/c mice. *Fed Proc* 36: 1158.
70. Oskouian B, Soriyakumaran P, Borowsky AD, Crans A, Dillard-Telm L, Tam YY, Bandhuvula P, Saba JD (2006) Sphingosine-1-phosphate lyase potentiates apoptosis via p53- and p38-dependent pathways and is down-regulated in colon cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 17384–17389.
71. Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, Xu Y, Camerer E, Zheng YW, Huang Y, Cyster JG, Coughlin SR (2007) Promotion of lymphocyte

- egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science* 316: 295–298.
72. Parkinson NJ, Baumer D, Rose-Morris A, Talbot K (2008) Candidate screening of the bovine and feline spinal muscular atrophy genes reveals no evidence for involvement in human motor neuron disorders. *Neuromuscul Disord* 18: 394–397.
  73. Pata MO, Hannun YA, Ng CK (2010) Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. *New Phytol* 185: 611–630.
  74. Patterson MC, Vanier MT, Suzuki K, Morrie JA, Carstea E, Neufeld EB, Blanchette-Mackie JE, Pentchev PG (2009) Niemann-Pick Disease Type C: A Lipid Trafficking Disorder, in: *Scriver's OMMBID (Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease)*. Valle, et al., New York.
  75. Penno A, Reilly MM, Houlden H, Laurá M, Rentsch K, Niederkofler V, Stoeckli ET, Nicholson G, Eichler F, Brown RH Jr, von Eckardstein A, Hornemann T (2010) Hereditary sensory neuropathy type 1 is caused by the accumulation of two neurotoxic sphingolipids. *J Biol Chem* 285: 11178–11187.
  76. Pentchev PG, Gal AE, Booth AD, Omodeo-Sale F, Fouks J, Neumeyer BA, Quirk JM, Dawson G, Brady RO (1980) A lysosomal storage disorder in mice characterized by a dual deficiency of sphingomyelinase and glucocerebrosidase. *Biochim Biophys Acta* 619: 669–679.
  77. Pewzner-Jung Y, Brenner O, Braun S, Laviad EL, Ben-Dor S, Feldmesser E, Horn-Saban S, Amann-Zalcenstein D, Raanan C, Berkutzki T, Erez-Roman R, Ben-David O, Levy M, Holzman D, Park H, Nyska A, Merrill AH Jr, Futerman AH (2010) A critical role for ceramide synthase 2 in liver homeostasis: II. insights into molecular changes leading to hepatopathy. *J Biol Chem* 285: 10911–10923.
  78. Pewzner-Jung Y, Park H, Laviad EL, Silva LC, Lahiri S, Stiban J, Erez-Roman R, Brügger B, Sachsenheimer T, Wieland F, Prieto M, Merrill AH Jr, Futerman AH (2010) A critical role for ceramide synthase 2 in liver homeostasis: I. alterations in lipid metabolic pathways. *J Biol Chem* 285: 10902–10910.
  79. Rao RP, Acharya JK (2008) Sphingolipids and membrane biology as determined from genetic models. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 85: 1–16.
  80. Raya A, Revert F, Navarro S, Saus J (1999) Characterization of a novel type of serine/threonine kinase that specifically phosphorylates the human goodpasture antigen. *J Biol Chem* 274: 12642–12649.
  81. Reimann HA, McKechnie WG, Stanisavljevic S (1958) Hereditary sensory radicular neuropathy and other defects in a large family: reinvestigation after twenty years and report of a necropsy. *Am J Med* 25: 573–579.
  82. Rodriguez-Lafrasse, C., Rousson, R., Pentchev, P.G., Louisot, P., Vanier, M.T., 1994. Free sphingoid bases in tissues from patients with type C Niemann-Pick disease and other lysosomal storage disorders. *Biochim. Biophys. Acta* 1226, 138–144.
  83. Rotthier A, Auer-Grumbach M, Janssens K, Baets J, Penno A, Almeida-Souza L, Van Hoof K, Jacobs A, De Vriendt E, Schlotter-Weigel B, Löscher W, Vondráček P, Seeman P, De Jonghe P, Van Dijck P, Jordanova A, Hornemann T, Timmerman V (2010) Mutations in the SPTLC2 subunit of serine palmitoyltransferase cause hereditary sensory and autonomic neuropathy type I. *Am J Hum Genet* 87: 513–522.
  84. Rotthier A, Baets J, De Vriendt E, Jacobs A, Auer-Grumbach M, Lévy N, Bonello-Palot N, Kilic SS, Weis J, Nascimento A, Swinkels M, Kruyt MC, Jordanova A, De Jonghe P, Timmerman V (2009) Genes for hereditary sensory and autonomic neuropathies: a genotype-phenotype correlation. *Brain* 132: 2699–2711.



85. Sabourdy F, Kedjouar B, Sorli SC, Colié S, Milhas D, Salma Y, Levade T (2008) Functions of sphingolipid metabolism in mammals--lessons from genetic defects. *Biochim Biophys Acta* 1781: 145–183.
86. Schmahl J, Raymond CS, Soriano P (2007) PDGF signaling specificity is mediated through multiple immediate early genes. *Nat Genet* 39: 52–60.
87. Schulze H, Kolter T, Sandhoff K (2009) Principles of lysosomal membrane degradation: Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation. *Biochim Biophys Acta* 1793: 674–683.
88. Somers KL, Royals MA, Carstea ED, Rafi MA, Wenger DA, Thrall MA (2003) Mutation analysis of feline Niemann-Pick C1 disease. *Mol Genet Metab* 79: 99–103.
89. Taniguchi M, Shinoda Y, Ninomiya H, Vanier MT, Ohno K (2001) Sites and temporal changes of gangliosides GM1/GM2 storage in the Niemann-Pick disease type C mouse brain. *Brain Dev* 23: 414–421.
90. Van Veldhoven P (2005) Sphingosine 1-phosphate lyase deficient mice, in: 2. Presented at the 46th International Conference on the Bioscience of Lipids, Chemistry and Physics of Lipids, Ajaccio, FRANCE, pp. 164–165.
91. Vanier MT (2010) Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis* 5: 16.
92. Verhoeven K, Coen K, De Vriendt E, Jacobs A, Van Gerwen V, Smouts I, Pou-Serradell A, Martin JJ, Timmerman V, De Jonghe P (2004) SPTLC1 mutation in twin sisters with hereditary sensory neuropathy type I. *Neurology* 62: 1001–1002.
- [93. Vite CH, Ding W, Bryan C, O'Donnell P, Cullen K, Aleman D, Haskins ME, Van Winkle T (2008) Clinical, electrophysiological, and serum biochemical measures of progressive neurological and hepatic dysfunction in feline Niemann-Pick type C disease. *Pediatr Res* 64: 544–549.
94. Vogel P, Donoviel MS, Read R, Hansen GM, Hazlewood J, Anderson SJ, Sun W, Swaffield J, Oravec T (2009) Incomplete inhibition of sphingosine 1-phosphate lyase modulates immune system function yet prevents early lethality and non-lymphoid lesions. *PLoS ONE* 4: e4112.
95. Vormoor J, Ehlert K, Groll AH, Koch HG, Frosch M, Roth J (2004) Successful hematopoietic stem cell transplantation in Farber disease. *J Pediatr* 144: 132–134.
96. Walia JS, Neschadim A, Lopez-Perez O, Alayoubi A, Fan X, Carpentier S, Madden M, Lee CJ, Cheung F, Jaffray DA, Levade T, McCart JA, Medin JA (2011) Autologous transplantation of lentivector/acid ceramidase-transduced hematopoietic cells in nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 22: 679–687.
97. Wang X, Rao RP, Kosakowska-Cholody T, Masood MA, Southon E, Zhang H, Berthet C, Nagashim K, Veenstra TK, Tessarollo L, Acharya U, Acharya JK (2009) Mitochondrial degeneration and not apoptosis is the primary cause of embryonic lethality in ceramide transfer protein mutant mice. *J Cell Biol* 184: 143–158.
98. Ward S, O'Donnell P, Fernandez S, Vite CH (2010) 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin raises hearing threshold in normal cats and in cats with Niemann-Pick type C disease. *Pediatr Res* 68: 52–56.
99. Weber C, Krueger A, Münk A, Bode C, Van Veldhoven PP, Gräler MH (2009) Discontinued postnatal thymocyte development in sphingosine 1-phosphate-lyase-deficient mice. *J Immunol* 183: 4292–4301.
100. Wennekes T, van den Berg RJBHN, Boot RG, van der Marel GA, Overkleeft HS, Aerts JMFG (2009) Glycosphingolipids--nature, function, and pharmacological modulation. *Angew Chem Int Ed Engl* 48: 8848–8869.
101. Xu YH, Barnes S, Sun Y, Grabowski GA (2010) Multi-system disorders of glycosphingolipid and ganglioside metabolism. *J Lipid Res* 51: 1643–1675.

102. Yoshimura Y, Tani M, Okino N, Iida H, Ito M (2004) Molecular cloning and functional analysis of zebrafish neutral ceramidase. *J Biol Chem* 279: 44012–44022.
103. Zemann B, Kinzel B, Müller M, Reuschel R, Mechtcheriakova D, Urtz N, Bornancin F, Baumruker T, Billich A (2006) Sphingosine kinase type 2 is essential for lymphopenia induced by the immunomodulatory drug FTY720. *Blood* 107: 1454–1458.
104. Zervas M, Dobrenis K, Walkley SU (2001) Neurons in Niemann-Pick disease type C accumulate gangliosides as well as unesterified cholesterol and undergo dendritic and axonal alterations. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 49–64.
105. Zhao L, Spassieva SD, Jucius TJ, Shultz LD, Shick HE, Macklin WB, Hannun YA, Obeid LM, Ackerman SL (2011) A deficiency of ceramide biosynthesis causes cerebellar purkinje cell neurodegeneration and lipofuscin accumulation. *PLoS Genet* 7: e1002063.
106. Zitomer NC, Mitchell T, Voss KA, Bondy GS, Pruett ST, Garnier-Amblard EC, Liebeskind LS, Park H, Wang E, Sullards MC, Merrill AH Jr, Riley RT (2009) Ceramide synthase inhibition by fumonisin B1 causes accumulation of 1-deoxysphinganine: a novel category of bioactive 1-deoxysphingoid bases and 1-deoxydihydroceramides biosynthesized by mammalian cell lines and animals. *J Biol Chem* 284: 4786–4795.

## Tables

Table 1: Mammalian genetic defects of simple sphingolipid biosynthesis.

Gene	Protein	Species	Disease	Gene defect	Changes in SL	Clinical and pathological phenotype	Age of death	Refs.
<b>SPTLC1</b>	SPT subunit 1	human	HSAN1	see text	Increased deoxySa and deoxymetSa	Hereditary sensory neuropathy type 1	Up to normal	(Rotthier et al., 2009; Penno et al., 2010)
<b>Sptlc1</b>	SPT subunit 1	mouse		SPTLC1 <sup>C133W</sup>	Elevated deoxySLs	Peripheral neuropathy with preceding hyperpathia		(McCampbell et al., 2005; Eichler et al., 2009)
				knockout	In heterozygotes, no changes in plasma SM levels, but reduced SM in apical membranes	Reduced intestinal cholesterol absorption in <i>Sptlc1</i> -/+ mice	Embryonic lethality of homozygotes	(Hojjati et al., 2005; Li, Park, et al., 2009)

<b>SPTLC2</b>	SPT subunit 2	human	HSAN1		of enterocytes	Hereditary sensory neuropathy type 1	(Rotthier et al., 2010)
<b>Sptlc2</b>	SPT subunit 2	mouse		knockout	In heterozygotes, no changes in plasma SM levels	Embryonic lethality of homozygotes	(Hojjati et al., 2005)
				liver-specific knockout	Reduced plasma and liver SM levels, and increased plasma apoE.	ND	(Li, Li, et al., 2009)
<b>FVT1</b>	3-ketosphinganine reductase	cattle		p.A175T	Not reported	Spinal muscular atrophy	(Krebs et al., 2007)
<b>Cers1</b>	Ceramide synthase 1	mouse	flincher toppler	single nucleotide	Reduced total, C18:0, C18:1 but	Cerebellar ataxia at 3 weeks of age;	(Zhao et al., 2011)

				deletion or substitution	increased C14 and C16:0 Cer levels in brain; increased So, Sa, S1P and dihydroS1P	Purkinje cell degeneration		
<b>Cers2</b>	Ceramide synthase 2	mouse	Gene trap in intron 1	Gene trap in intron 1	Reduced C22-C24 Cer in brain, liver and kidney; reduced C22-C24 SM in liver and kidney; reduced GalCer and sulfatide levels in sciatic nerves and myelin.	Abnormal myelin, impaired initiation of motor activity, liver tumors (between 7 and 9 months)	ND	(Imgrund et al., 2009)
			Gene trap in intron 1	Gene trap in intron 1	Reduced C22-C24 levels of Cer, SM	Weight loss; hepatomegaly, liver	About 16 months	(Pewzner-Jung, Brenner,

				and HexCer in liver; increased C16 Cer and Sa levels in liver; reduced C22-C24 non-hydroxy and 2-hydroxy-GalCer in brain.	nodules and hepatocarcinoma; astrogliosis, microglial activation and lysosomal storage of undefined material; myoclonic jerks	et al., 2010; Pewzner-Jung, Park, et al., 2010; Ben-David et al., 2011)
<b>Degs1</b>	Dihydroceramide desaturase	mouse	knockout	Reduced Cer and increased DH-Cer in homozygous 1-day-old pups	Small size, decreased body weight, scaly skin, tremor, failure to thrive of homozygous mice. Enhanced insulin sensitivity of heterozygous mice	(Holland et al., 2007)

Abbreviations : Cer, ceramide; DH-Cer, dihydroceramide; GalCer, galactosylceramide; HexCer, monohexosylceramide; ND : not defined.

Table 2: Mammalian genetic defects of simple sphingolipid catabolism.



Gene	Protein	Species	Disease	Gene defect	Changes in SL	Clinical phenotype	Age of death	Refs
<b>ASAH1</b>	aCDase	human	Farber		Increased Cer	Painful and deformed joints, subcutaneous nodules, hoarseness, neurological alterations, hepatosplenomegaly	0-30 years (often childhood)	(Levade et al., 2009)
<b>Asah1</b>	aCDase	mouse		knockout	Increased Cer	Apoptosis of embryos at the 2-cell stage	Embryonic death	(Li et al., 2002)
<b>Asah2</b>	aCDase	mouse		knockout	Increased Cer	No apparent pathology		(Kono et al., 2006)
<b>Sphk1</b>	Sphingosine kinase 1	mouse		knockout	Reduction of serum levels of S1P to less than 50%	Animals are viable, fertile and without any obvious abnormalities		(Allende et al., 2004)
<b>Sphk1</b>	Sphingosine kinase 1	mouse		knockout	Reduction of serum S1P	Animals are viable, fertile and without any obvious abnormalities		(Zemann et al.,

<b>Sphk2</b>	Sphingosine kinase 2	mouse	knockout	levels by 50% Reduction of plasma S1P levels by about 25%	Animals are viable, fertile and survive at least 12 months. Less homozygous mice than expected.	2006) (Kharel et al., 2005)
<b>Sphk2</b>	Sphingosine kinase 2	mouse	knockout	No difference in serum S1P level.	Animals are viable and fertile. No major histological abnormalities	(Zemann et al., 2006)
<b>Sphk2</b>	Sphingosine kinase 2	mouse	knockout	N.E.	Animals are fertile and have normal longevity. No histological abnormalities.	(Mizugishi et al., 2005)
<b>Sphk1+</b>	Sphingosine kinases	mouse	knockout	Undetectable S1P levels in whole double null embryos at E11.5.	Abnormal cardiovascular, muscular and neural system development. Infertility of <i>Sphk1</i> <sup>-/-</sup> <i>Sphk2</i> <sup>+/-</sup> female mice.	Embryonic death (E13.5) (Mizugishi et al., 2007)
<b>Sphk2</b>				Accumulation of Sa and So in		

		<i>Sphk1</i> <sup>-/-</sup>					
<b>Sphk1+</b> <b>Sphk2</b>	Sphingosine kinases	mouse	Double conditional knockout	Undetectable plasma and lymph S1P levels.	Mice generated at P5 survived to adulthood and were indistinguishable from littermates. Reduction of blood and lymph B cell counts, but normal number of B cells in the spleen and lymph nodes. Accumulation of mature T cells in the thymus. Decreased number of mature B cells in the bone marrow.	(Pappu et al., 2007)	
<b>Sgpl1</b>	S1P lyase	mouse	knockout	N.E.	Growth failure, vascular abnormalities, hemorrhage, anemia, skeletal defects and renal abnormalities	(Schmahli et al., 2007)	8 weeks
<b>Sgpl1</b>	S1P lyase	mouse	knockout	Elevated levels of S1P in spleen and serum. Accumulation of	Apparently healthy at birth. Loss of weight in the postnatal period and premature death. Mature T cells sequestration in thymus leading to	(Van Veldhoven, 2007)	Death during the first weeks

			S1P, So and C16-Cer in thymus.	lymphopenia. Decreased size of spleen and thymus. Increased levels of pro-inflammatory cytokines. Pulmonary, hematologic, and cardiac defects. Urothelial lesions.	(median 29 days)	2005; Vogel et al., 2009; Weber et al., 2009; Allende et al., 2011)
<b>Sgpl1</b>	S1P lyase	mouse	knock-in	Elevated S1P level in spleen.	Viable and fertile. Lymphopenia (B and T cells), lymphocytes retention in thymus and secondary lymphoid organs.	(Vogel et al., 2009)

Abbreviations N.E., not examined ; Sa, sphinganine ; So, sphingosine.

Table 3: Mammalian genetic defects of simple sphingolipid transport.

Gene	Protein	Species	Disease	Gene defect	Changes in SL	Clinical and pathological phenotype	Age of death	Refs.
<b>Col4a3bp</b>	Cert	mouse		knockout	Increased Cer levels in ER and mitochondria; decreased SM levels	Embryonic lethality; cardiac abnormalities, structural and functional defects of ER and mitochondria	E11.5	(Wang et al., 2009)
<b>NPC1</b>	Niemann-Pick C1 protein	human	Niemann-Pick type C		In liver and spleen, accumulation of FC, SM, LBPA, GlcCer, LacCer, So (x20) and Sa	Neonatal cholestasis, hepatosplenomegaly, progressive neurological deterioration, vertical supranuclear gaze palsy. Neuroinflammation, neuroaxonal dystrophy,	0-60 years and more (most often 10-25 years)	(Patterson et al., 2009; Vanier, 2010)

				In brain, storage of GM2, GM3 and So (x3)	Purkinje cell death. Foamy cells and sea-blue histiocytes in visceral organs.		
<b>Npc1</b>	Niemann- Pick C1 protein	mouse	<i>Spm</i> (mutation ND) and <i>npc<sup>nih</sup></i> (retrotrans poson-like insertion and 703 bp deletion)	In liver and spleen: SM, FC, GlcCer, LacCer accumulation. In liver: LBPA, GM3 and GA2. In brain: FC, GM1, GM2 and GM3 storage	Neurological symptoms, weight loss, lymph nodes enlargement, infertile. Brain and cerebellar atrophy. Dysmyelination, neuronal storage and axonal spheroids. Foamy macrophages in liver and spleen. Severe Purkinje cell depletion.	12-14 weeks (for <i>Spm</i> ) 10 weeks (for <i>npc<sup>nih</sup></i> )	(Morris et al., 1977; Pentchev et al., 1980; Miyawaki et al., 1982; Kuwamura et al., 1993; Taniguchi et al., 2001; Zervas et al., 2001; Patterson et al., 2009; Vanier, 2010)
<b>Npc1</b>	Niemann- mouse		Conditiona		Motor deficits by 10 weeks.	No	(Elrick et al., 2010)

	Pick C1 protein		I knockout in cerebellar Purkinje cells	Progressive loss of Purkinje cells in an anterior-to-posterior gradient.	premature death	
<b>Npc1</b>	Niemann-cat Pick C1 protein	cat	p.C955S In the liver, FC, GlcCer, LacCer and SM storage. In the brain, GM2 and GM3 accumulation.	Progressive neurological disorders : ataxia, tremors. Growth retardation. Neuroaxonal dystrophy. Foamy macrophages in liver, spleen, lymph nodes, and lung.	About 20 weeks (euthanazied at 9 weeks)	(Lowenthal et al., 1990; Somers et al., 2003; Vite et al., 2008)
<b>Npc1</b>	Niemann-dog Pick C1 protein	dog	ND In liver and spleen, FC (but no SM) storage. GM2, GM3 and LacCer	Progressive neurological disorder: unable to stand at 9 months. Mild cerebellar atrophy. No hepatosplenomegaly. Foamy macrophages in	Euthanazied at 9 months	(Kuwamura et al., 1993)

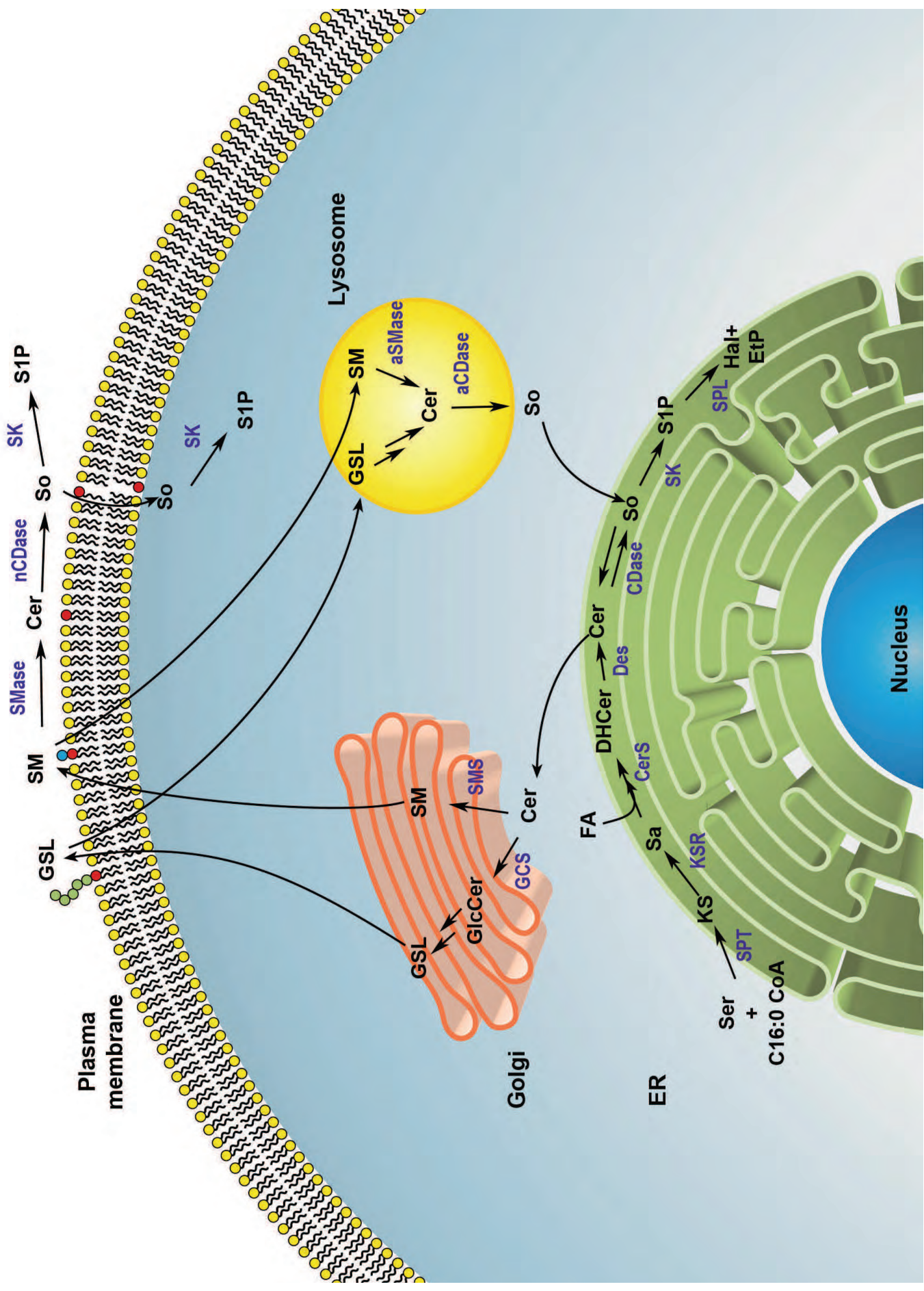


			accumulation in brain.		
				liver, spleen, lymph nodes, and lung. Marked loss of Purkinje and granular cells in the cerebellum.	

Abbreviations : Cer, ceramide ; DH-Cer, dihydroceramide ; FC, free cholesterol ; GalCer, galactosylceramide ; HexCer, monohexosylceramide ; LBPA, lysobisphosphatidic acid ; NPC, Niemann-Pick disease type C ; Sa, sphinganine ; So, sphingosine ; ND : not defined.

## Figure legend

**Figure 1:** Schematic view of the subcellular compartmentalization of sphingolipid metabolism. Abbreviations: CDase, ceramidase ; aCDase, acid CDase ; nCDase, neutral CDase ; Cer, ceramide ; CerS, ceramide synthase ; Des, desaturase ; DHCer, dihydroceramide ; EtP, ethanolamine phosphate ; FA, fatty acid ; GlcCer, glucosylceramide ; GSL, glycosphingolipid ; Hal, hexadecenal ; KS, ketosphinganine ; KSR, KS reductase ; Sa, sphinganine ; Ser, L-serine ; SK, sphingosine kinase ; SM, sphingomyelin ; SMase, sphingomyelinase ; aSMase, acid SMase ; SMS, SM synthase ; So, sphingosine ; SPL, S1P lyase ; SPT, serine-palmitoyltransferase ; S1P, sphingosine 1-phosphate.





**ARTICLE :**

**Disruption of sphingosine 1-phosphate lyase confers resistance to chemotherapy and promotes oncogenesis through Bcl-2/Bcl-xL upregulation.**

# Cancer Research



## Disruption of Sphingosine 1-Phosphate Lyase Confers Resistance to Chemotherapy and Promotes Oncogenesis through Bcl-2/Bcl-xL Upregulation

Sandra Colié, Paul P. Van Veldhoven, Blandine Kedjouar, et al.

*Cancer Res* 2009;69:9346-9353. Published OnlineFirst November 24, 2009.

<b>Updated Version</b>	Access the most recent version of this article at: <a href="https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2198">doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2198</a>
<b>Supplementary Material</b>	Access the most recent supplemental material at: <a href="http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2009/11/24/0008-5472.CAN-09-2198.DC1.html">http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2009/11/24/0008-5472.CAN-09-2198.DC1.html</a>

<b>Cited Articles</b>	This article cites 50 articles, 17 of which you can access for free at: <a href="http://cancerres.aacrjournals.org/content/69/24/9346.full.html#ref-list-1">http://cancerres.aacrjournals.org/content/69/24/9346.full.html#ref-list-1</a>
<b>Citing Articles</b>	This article has been cited by 3 HighWire-hosted articles. Access the articles at: <a href="http://cancerres.aacrjournals.org/content/69/24/9346.full.html#related-urls">http://cancerres.aacrjournals.org/content/69/24/9346.full.html#related-urls</a>

<b>E-mail alerts</b>	<a href="#">Sign up to receive free email-alerts</a> related to this article or journal.
<b>Reprints and Subscriptions</b>	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at <a href="mailto:pubs@aacr.org">pubs@aacr.org</a> .
<b>Permissions</b>	To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at <a href="mailto:permissions@aacr.org">permissions@aacr.org</a> .

## Disruption of Sphingosine 1-Phosphate Lyase Confers Resistance to Chemotherapy and Promotes Oncogenesis through Bcl-2/Bcl-xL Upregulation

Sandra Colié,<sup>1,2</sup> Paul P. Van Veldhoven,<sup>4</sup> Blandine Kedjouar,<sup>1,2</sup> Carmen Bedia,<sup>1,2</sup> Virginie Albinet,<sup>1,2</sup> Sonia-Caroline Sorli,<sup>1,2</sup> Virginie Garcia,<sup>1,2</sup> Mojgan Djavaheri-Mergny,<sup>5</sup> Chantal Bauvy,<sup>5</sup> Patrice Codogno,<sup>5</sup> Thierry Levade,<sup>1,2,3</sup> and Nathalie Andrieu-Abadie<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INSERM U858; <sup>2</sup>Université Paul Sabatier Toulouse III, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil; <sup>3</sup>Laboratoire de Biochimie Métabolique, CHU Toulouse, Toulouse, France; <sup>4</sup>LIPIT, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium; and <sup>5</sup>INSERM U756, Chatenay-Malabry, France

### Abstract

**Sphingosine 1-phosphate (S1P) is a bioactive sphingolipid metabolite involved in cancer development through stimulation of cell survival, proliferation, migration, and angiogenesis. Irreversible degradation of S1P is catalyzed by S1P lyase (SPL). The human *SGPL1* gene that encodes SPL maps to a region often mutated in cancers. To investigate the effect of SPL deficiency on cell survival and transformation, the susceptibility to anticancer drugs of fibroblasts generated from SPL-deficient mouse embryos (*Sgpl1*<sup>-/-</sup>) was compared with that of cells from heterozygous (*Sgpl1*<sup>+/-</sup>) or wild-type (*Sgpl1*<sup>+/+</sup>) embryos. First, loss of SPL caused resistance to the toxic effects of etoposide and doxorubicin. Interestingly, heterozygosity for the *Sgpl1* gene resulted in partial resistance to apoptosis. Secondly, doxorubicin-induced apoptotic signaling was strongly inhibited in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> cells (phosphatidylserine externalization, caspase activation, and cytochrome *c* release). This was accompanied by a strong increase in Bcl-2 and Bcl-xL protein content. Whereas correction of SPL deficiency in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> cells led to downregulation of antiapoptotic proteins, Bcl-2 and Bcl-xL small interfering RNA-mediated knockdown in SPL-deficient cells resulted in increased sensitivity to doxorubicin, suggesting that Bcl-2 upregulation mediates SPL protective effects. Moreover, SPL deficiency led to increased cell proliferation, anchorage-independent cell growth, and formation of tumors in nude mice. Finally, transcriptomic studies showed that SPL expression is downregulated in human melanoma cell lines. Thus, by affecting S1P metabolism and the expression of Bcl-2 members, the loss of SPL enhances cell resistance to anticancer regimens and results in an increased ability of cells to acquire a transformed phenotype and become malignant. [Cancer Res 2009;69(24):9346–53]**

### Introduction

Sphingolipids are essential ubiquitous constituents of membranes and, notably, microdomains (1). However, like mediators derived from glycerophospholipids, sphingolipids are a source of

an important family of bioactive signaling molecules that regulate numerous physiologic and pathologic processes (2). The importance of sphingolipids in human health and disease is illustrated by the dramatic consequences of inherited disruption of their normal metabolism (3) and also by their involvement as bioeffector molecules in cancer and hematologic malignancies (4–6). The best characterized sphingolipid mediators are ceramide and sphingosine 1-phosphate (S1P): whereas ceramide generally transduces antiproliferative responses, the lysolipid S1P has crucial roles in cell survival, cell migration, and angiogenesis and as well as immune responses (7).

S1P exerts its effects either through autocrine and paracrine actions as a ligand for a family of specific G protein-coupled receptors (S1P<sub>1-5</sub>) as well as by intracellular functions as a second messenger involved in the control of cell growth and death signaling pathways (8, 9). Both intracellular and circulating levels of S1P depend on the activity of some membrane transporters and of three classes of enzymes that control its metabolism. Whereas sphingosine kinases 1 (SK1) and 2 produce S1P by phosphorylating sphingosine, two S1P phosphatases dephosphorylate S1P to generate sphingosine, and S1P lyase (SPL) irreversibly degrades S1P to phosphoethanolamine and 2-*trans* hexadecenal (10). The critical role played by S1P as a “tumor-promoting” agent has been mostly evidenced through manipulation of the expression and biological activity of SK1. Indeed, SK1 is overexpressed in multiple types of cancers and upregulation of SK1 has been associated with tumor angiogenesis and resistance to radiation and chemotherapy. Conversely, pharmacologic or genetic inhibition of SK1 activity *in vitro* on different cultured tumor cell models and *in vivo* on transplanted animals has been shown to enhance drug-induced lethality (11, 12). Furthermore, S1P-generating enzyme SK1 acts as an oncogene because NIH3T3 fibroblasts overexpressing SK1 acquired a transformed phenotype and the capability to form tumors in nude mice (13).

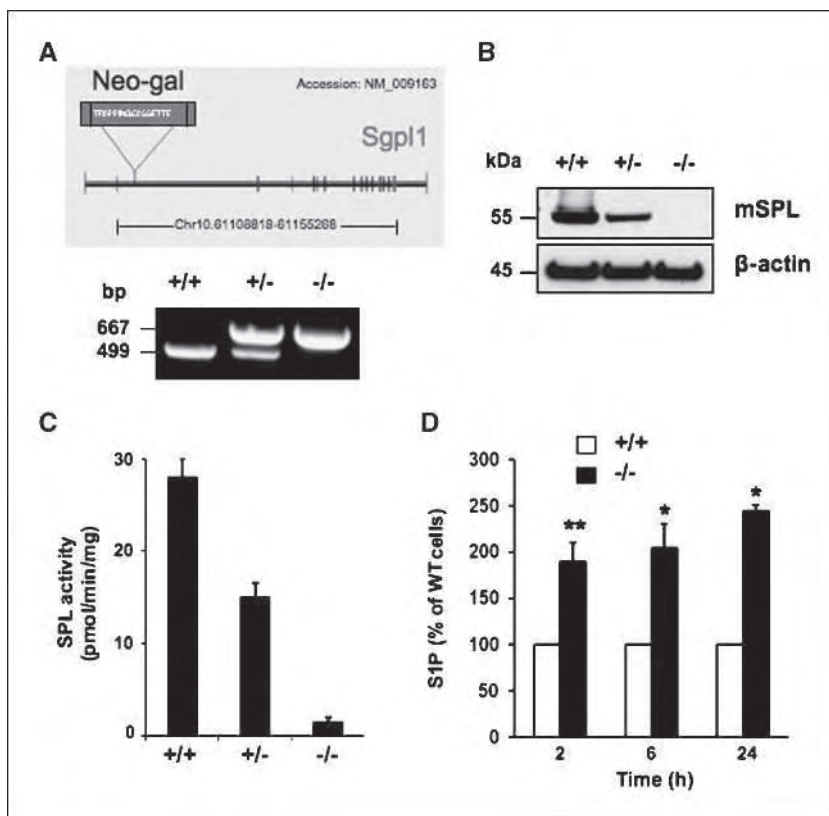
Of the enzymes involved in determining S1P abundance, SPL represents an undeniable candidate as potential regulator of cell's fate in response to stress (14). SPL is a microsomal pyridoxal 5'-phosphate-dependent aldehyde-lyase that catalyzes the irreversible cleavage of S1P in the final step of sphingolipid catabolism (15, 16). In mammalian cells, overexpression of SPL was shown to sensitize cells to apoptotic stress such as serum deprivation and chemotherapy (17–19). SPL-induced apoptosis requires its enzyme activity and can be blocked by addition of exogenous S1P (17). In contrast, products of the lyase reaction had no effect on apoptosis. The cytotoxic effect of SPL appears to be dependent on the activation of proapoptotic signaling pathways involving

**Note:** Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

**Requests for reprints:** Nathalie Andrieu-Abadie, INSERM U858, BP84225, 31432 Toulouse cedex 4, France. Phone: 33-561-32-35-31; Fax: 33-561-32-20-84; E-mail: [nathalie.andrieu@inserm.fr](mailto:nathalie.andrieu@inserm.fr).

©2009 American Association for Cancer Research.  
doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2198

**Figure 1.** Disruption of S1P catabolism in SPL-deficient mouse embryonic fibroblasts. **A**, schematic view of *Sgpl1* gene trap and genotype of wild-type (+/+), heterozygous (+/-), and SPL-deficient (-/-) cells. Genomic DNA was extracted and amplified using one set of primers for wild-type mSPL (499-bp PCR product) and another set of primers for lacZ (667-bp PCR product). **B**, Western blot analysis of mSPL expression in wild-type, heterozygous, and SPL-deficient MEFs. **C**, SPL enzyme activity in MEFs. Mean  $\pm$  SE of three independent experiments. **D**, intracellular concentration of S1P in wild-type and SPL-deficient MEFs as determined by the conversion of [<sup>3</sup>H]sphingosine to [<sup>3</sup>H]S1P. Levels of radiolabeled S1P are expressed as mean  $\pm$  SE of three independent experiments done in duplicate.



p38 mitogen-activated protein kinase, p53, caspase-2, and caspase-3 (19). However, whereas SK1 overexpression was associated with upregulation of the antiapoptotic protein Bcl-2 (20, 21), the connection between SPL with Bcl-2 family members has never been investigated.

Interestingly, the *SGPL1* gene, which encodes SPL, has been reported to be significantly downregulated in human colon cancer tissues compared with normal tissues (22). Moreover, the human *SGPL1* gene maps to chromosomal region 10q21 (23), which is deleted or mutated in many human tumor types (24–26). Altogether, these observations suggest that loss of SPL expression might potentiate cancer cell proliferation and contribute to tumorigenesis; this, however, remains to be demonstrated.

Here, we report that the lack of SPL leads to upregulation of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL and consequently protects against apoptosis induced by chemotherapeutic agents but not autophagy. Moreover, SPL-deficient cells isolated from *Sgpl1*<sup>-/-</sup> mouse embryos showed an increase in cell growth rate in culture, colony formation in soft agar, and tumor progression in nude mice compared with cells isolated from wild-type embryos. Collectively, this study suggests that SPL behaves as a tumor suppressor and may represent a novel target for therapeutic intervention in cancer.

## Materials and Methods

**Cell culture and genotyping.** *Sgpl1*<sup>+/-</sup> mice were generated from OST58278 (27) gene-trapped ES cells, bought from OmniBank, by Lexicon Genetics on a fee basis, and inbred into a C57BL/6 background as reported (28).<sup>6</sup> Heterozygous mice were mated and murine embryonic fibroblasts

(MEF) were prepared at embryonic day 16 from the skin of wild-type (*Sgpl1*<sup>+/+</sup>), SPL heterozygous (*Sgpl1*<sup>+/-</sup>), and SPL-deficient (*Sgpl1*<sup>-/-</sup>) embryos. By dilution culturing, spontaneously immortalized MEFs were obtained. Cells were grown in DMEM containing 10% FCS (Invitrogen) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> humidified incubators. Total genomic DNA was extracted and quantified using the Nanodrop ND-1000. Fragments derived from the  $\beta$ -geo and *Sgpl1* sequences were amplified by duplex PCR using the following primers: Gal-2s 5'-CgAATACCTgTTCCgTCATAgC, Gal-2r 5'-ACCACTACCATCAT-CAATCCggTAG, MmSPL-Trap-s 5'-TgATAgggCTgAAAACCACTg, and MmSPL-Trap-r 5'-TCAgAagCAAAACTgCCTTg. Amplification was carried out for 35 cycles using an annealing temperature of 60°C. DNA fragments were analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel.

**Vectors and cell transfections.** The cDNA encoding mSPL (29) was amplified by PCR using Phusion polymerase (Finnzymes) and oligonucleotides matching the first and last bases, respectively, of the *Sgpl1* sequence and containing *Afl*III and *Xho*I restriction sites. The amplification product was cloned in the pcDNA5/TO vector (Invitrogen) and its sequence was verified. Then, SPL-deficient cells were transfected with the pcDNA5TO-mSPL vector using Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

Transient interference was achieved by a pool of four small interfering RNAs (siRNA) specific for SPL, Bcl-2, or Bcl-xL (ON-TARGETplus SMART-pool; Dharmacon) or aleatory sequence scrambled siRNA. siRNA targeting SPL or Bcl-2 and Bcl-xL were transfected into wild-type or *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs, respectively, grown to 70% to 90% confluence using Lipofectamine 2000. After 48 h of transfection, doxorubicin was added to the medium and incubated for 24 h before evaluation of cell viability.

**Cell viability, flow cytometry, and morphologic analyses.** For cytotoxicity assays, cells were seeded in flat-bottomed 24-well plates (4  $\times$  10<sup>5</sup> per well). After 24 h, the medium was replaced with fresh medium containing 5% FCS and etoposide or doxorubicin, and cells were incubated at 37°C for different times. Cell viability was assessed using the MTT assay (Euromedex).

Phosphatidylserine externalization was evaluated by flow cytometry after labeling with Annexin V-FITC (250 ng/mL) and propidium iodide (12.5  $\mu$ g/mL; AbCys) using a FACScan (BD Biosciences) cytometer.

<sup>6</sup> P.P. Van Veldhoven, in preparation.



For analysis of cytochrome *c* release, cells seeded on glass coverslips at  $2 \times 10^4$ /mL were incubated with doxorubicin, fixed with formaldehyde (4%), washed with PBS, permeabilized with Triton X-100 (0.1%), and stained with a monoclonal anti-cytochrome *c* antibody (BD Pharmingen) and a secondary Alexa 488-labeled antibody (Molecular Probes/Invitrogen).

**DEVD cleavage enzyme assay.** Cell lysates were incubated for 30 min with Ac-Asp-Glu-Val-Asp-aminomethylcoumarin (Alexis). The amount of the released fluorescent product was determined fluorometrically at 351 and 430 nm for the excitation and emission wavelengths, respectively. Protein concentrations were determined according to the Bradford method.

**Western blot analyses.** Equal amounts of proteins were electrophoresed on a 10% to 15% SDS-polyacrylamide gel, transferred to a nitrocellulose membrane (Perkin-Elmer), and blotted with monoclonal anti-caspase-3, anti-caspase-9, anti-Bcl-xL, polyclonal anti-caspase-7, anti-Bid or polyclonal anti-poly(ADP-ribose) polymerase, and anti- $\beta$ -actin antibodies (Cell Signaling Technology). Polyclonal anti-Bax and anti-Bcl-2 antibodies were from BD Pharmingen. Proteins were detected using an enhanced chemiluminescence detection system (Pierce). SPL was detected using a rabbit polyclonal anti-mouse SPL antibody kindly provided by Drs. M. Ikeda and A. Kihara.

**SPL assay.** SPL enzyme activity was determined on cell lysates using D-erythro-[4,5- $^3$ H]dihydro-S1P (ARC/Isobio) as described (30).

**S1P measurements.** The amount of cellular S1P was evaluated as reported (31) using D-erythro-[3- $^3$ H]sphingosine (0.45  $\mu$ Ci/mL; 1.5  $\mu$ mol/L; Perkin-Elmer).

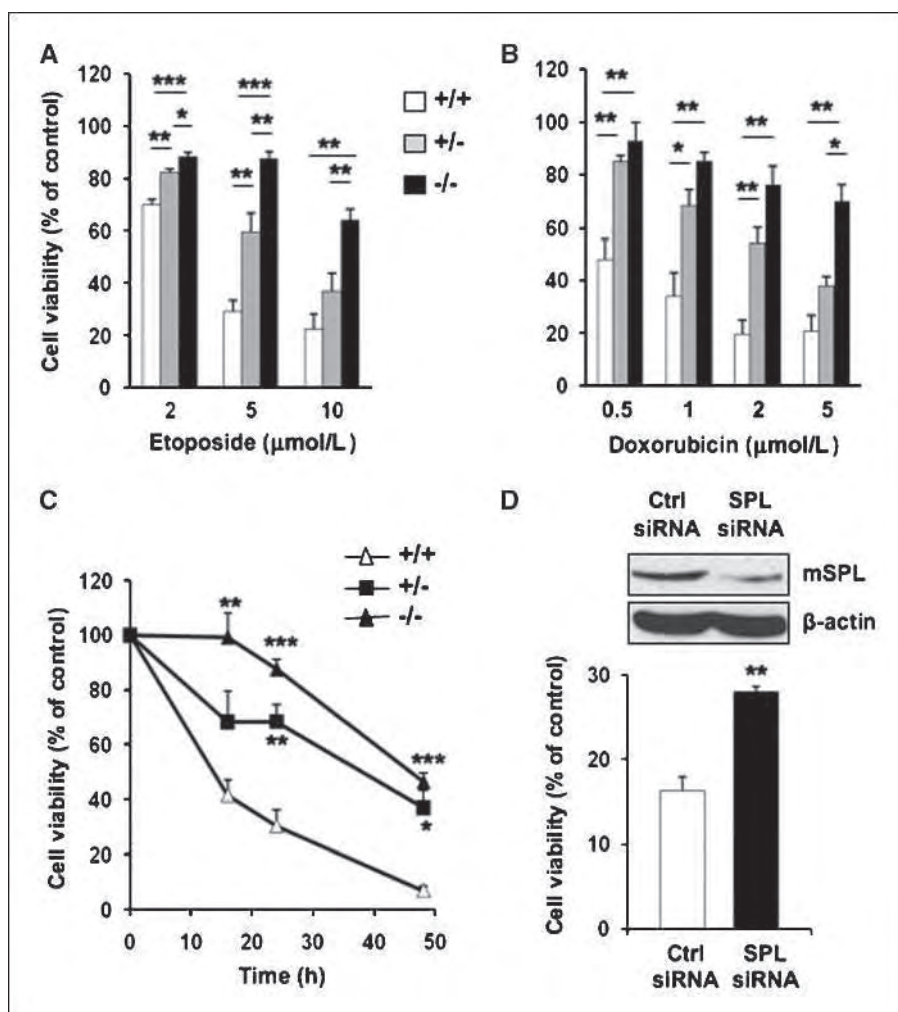
**Anchorage-independent growth assay.** Six-well plates were precoated with 2 mL DMEM containing 10% FCS and 0.6% agar. DMEM (2 mL) contain-

ing 10% FCS, 0.3% agar, and 5,000 cells were overlaid onto the precoated wells. After 2 weeks' incubation at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, cell colonies were visualized by MTT staining (500  $\mu$ g/mL) and photographed.

**Tumor growth (allograft mouse models).** *Sgpl1*<sup>+/+</sup> and *Sgpl1*<sup>-/-</sup> cells were trypsinized, washed, and resuspended at  $5 \times 10^6$ /mL in sterile PBS. One hundred microliters were injected s.c. into the flank of 4-week-old female nude mice (NMRI-nu; Janvier) and tumors were allowed to develop for up to 40 days. Tumor volumes were calculated as described (32). All experiments were done in accordance with the principles and guidelines established by INSERM and were approved by the local animal care and use committee.

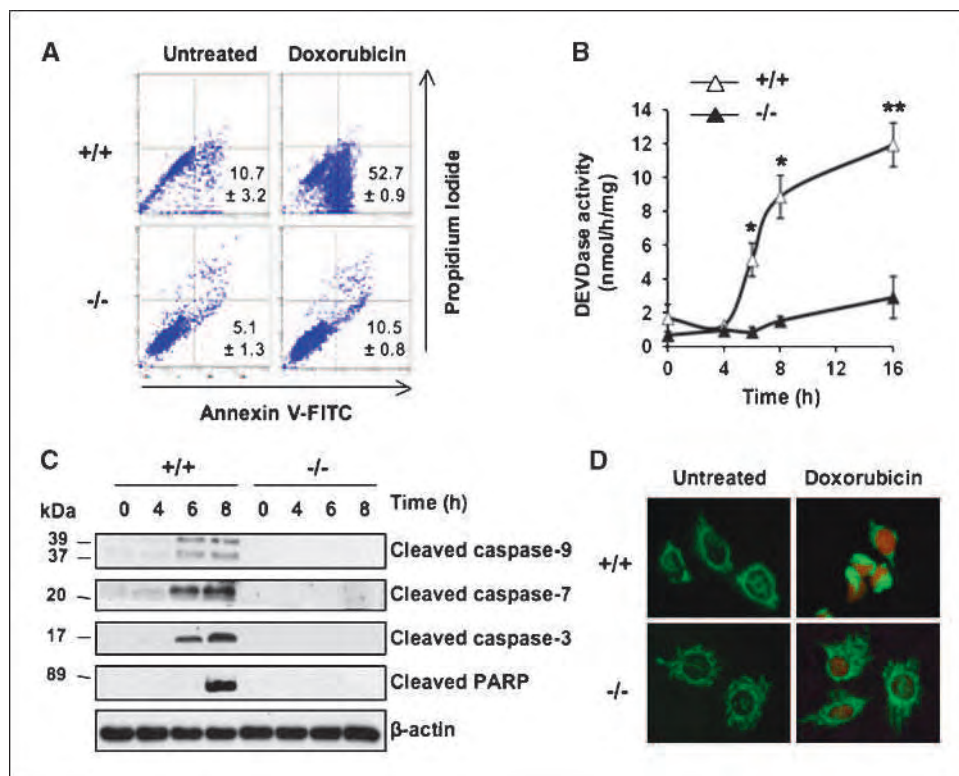
**Quantitative real-time PCR.** Nonconfluent human melanoma cell lines (American Type Culture Collection) and normal epidermal melanocytes (derived from adult skin NHEM-M2 or juvenile foreskin NHEM-f; Promo-Cell) were harvested and RNA was extracted (RNeasy kit; Qiagen) according to the manufacturer's protocol and treated with DNase (Qiagen). RNA quality was assessed by automated gel electrophoresis (Experion; Bio-Rad). RNA (2  $\mu$ g) was reverse-transcribed (SuperScript II; Invitrogen) and used as a template for quantitative PCR. The reactions were done in duplicate on the StepOne instrument (Applied Biosystems) using SYBR Green PCR kit and primer assay (QuantiTect; Qiagen). The results were quantified using the system software. mRNA of TBP, TFRC, and  $\beta$ -actin were analyzed for normalization.

**Statistical analyses.** Results are expressed as mean  $\pm$  SE. Student's *t* test was used for statistical comparisons among groups and differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$  (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).



**Figure 2.** Resistance of SPL-deficient cells to anticancer agents. Wild-type, heterozygous, and SPL-deficient MEFs were incubated for 24 h in medium containing 5% FCS in the absence or presence of the indicated concentrations of etoposide (A) or doxorubicin (B). Alternatively, cells were incubated for the indicated times in the absence or presence of 1  $\mu$ mol/L doxorubicin (C). Viability was assessed using the MTT test and is expressed as percentage of the value determined at the corresponding time in the absence of the drug. Mean  $\pm$  SE of four to eight independent experiments done in triplicate. D, wild-type MEFs were transfected with control (Ctrl) or SPL targeting siRNAs. SPL expression was evaluated by Western blotting (top). After 48 h of transfection with the siRNA and 24 h treatment with doxorubicin (1  $\mu$ mol/L), cell viability was evaluated using the MTT test. Mean  $\pm$  SE of three independent experiments.

**Figure 3.** Doxorubicin-induced apoptosis is impaired in SPL-deficient cells. **A**, wild-type and SPL-deficient cells were incubated for 16 h in medium containing 5% FCS in the absence or presence of doxorubicin (1  $\mu\text{mol/L}$ ). Cells were labeled with Annexin V-FITC and propidium iodide and analyzed by flow cytometry. Percentages (mean  $\pm$  SE of three independent experiments) of propidium iodide-negative/Annexin V-positive cells are indicated. **B** and **C**, wild-type and SPL-deficient cells were incubated with doxorubicin (1  $\mu\text{mol/L}$ ) for the indicated times. **B**, effector caspase (DEVDase) activity was measured (mean  $\pm$  SE of four independent experiments). **C**, cell lysates (30  $\mu\text{g}$  protein) were subjected to SDS-PAGE and Western blotted with anti-caspase-9, caspase-7, caspase-3, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), and  $\beta$ -actin antibodies. Representative of at least three independent experiments. **D**, wild-type and SPL-deficient MEFs grown on glass coverslips were incubated for 8 h in the absence or presence of doxorubicin (1  $\mu\text{mol/L}$ ) and then stained using anti-cytochrome *c* antibody. The red staining corresponds to the fluorescence emitted by doxorubicin.



## Results

**Gene dosage effect of *Sgpl1* on cell death induced by chemotherapeutic drugs.** To address the effect of SPL deficiency on anticancer drug-induced cell death, we first used a genetic approach by testing mutant MEFs derived from heterozygous (*Sgpl1*<sup>+/-</sup>) and homozygous (*Sgpl1*<sup>-/-</sup>) SPL-null mouse embryos. *Sgpl1*<sup>+/-</sup> and *Sgpl1*<sup>-/-</sup> cells carry a  $\beta$ -galactosidase-neomycin fusion gene trap cassette within the second intron of the *Sgpl1* gene (Fig. 1A). Only in these mutant cells bacterial  $\beta$ -galactosidase activity was measurable (Supplementary Fig. S1). Moreover, Western blot analysis using an antibody raised against the murine SPL protein (Fig. 1B) and SPL enzymatic assay (Fig. 1C) confirmed that SPL expression and activity were decreased in *Sgpl1*<sup>+/-</sup> cells and abolished in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> cells compared with wild-type cells. Disruption of *Sgpl1* gene was accompanied by an intracellular increase of SIP levels (Fig. 1D; Supplementary Table S1).

The importance of SPL in stress-induced cell death was investigated by treating wild-type and SPL mutant cells with various concentrations of etoposide (Fig. 2A) and doxorubicin (Fig. 2B). These agents led to a dose- and time-dependent reduction in the viability of *Sgpl1*<sup>+/-</sup> cells (Fig. 2C; Supplementary Fig. S2A). Under all concentrations tested, *Sgpl1*<sup>+/-</sup> MEFs were significantly less sensitive to the lethal effects of the drugs than their normal counterparts, whereas *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs were highly resistant. Interestingly, the chemoresistance of heterozygous and homozygous cells was also observed in primary MEFs (Supplementary Fig. S3) as well as SV40-transformed MEFs (data not shown). Furthermore, nuclear condensation observed in doxorubicin-treated *Sgpl1*<sup>+/-</sup> cells by fluorescence microscopy was reduced in *Sgpl1*<sup>+/-</sup> and completely abolished in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> cells (Supplementary Fig. S2B). Finally, *Sgpl1*<sup>+/-</sup> MEFs transfected with a siRNA targeting SPL, which reduced SPL

protein content by  $\sim$ 50%, became partially resistant to doxorubicin (Fig. 2D). Similar observations were made on NIH3T3 fibroblasts treated with mSPL siRNA (data not shown). These data point to a strong correlation between SPL expression and cell sensitivity to chemotherapy.

**SPL is required for apoptosis induced by doxorubicin.** To substantiate the importance of SPL in anticancer drug-induced cell death, the apoptotic cascade activated by doxorubicin in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> cells was analyzed. Of note, intracellular uptake of doxorubicin, analyzed by fluorometry, was similar in *Sgpl1*<sup>+/+</sup> and *Sgpl1*<sup>-/-</sup> cells (data not shown but illustrated in Fig. 3D by the red fluorescence of the nuclei). In wild-type but not in SPL-deficient cells, doxorubicin led to an increased proportion of Annexin V-positive and propidium iodide-negative cells, cells with externalized phosphatidylserine (Fig. 3A). These results are consistent with the absence of morphologic alterations such as nuclear condensation observed in mutant cells compared with control cells (Supplementary Fig. S2B) and suggest that apoptosis is impaired in SPL-deficient cells.

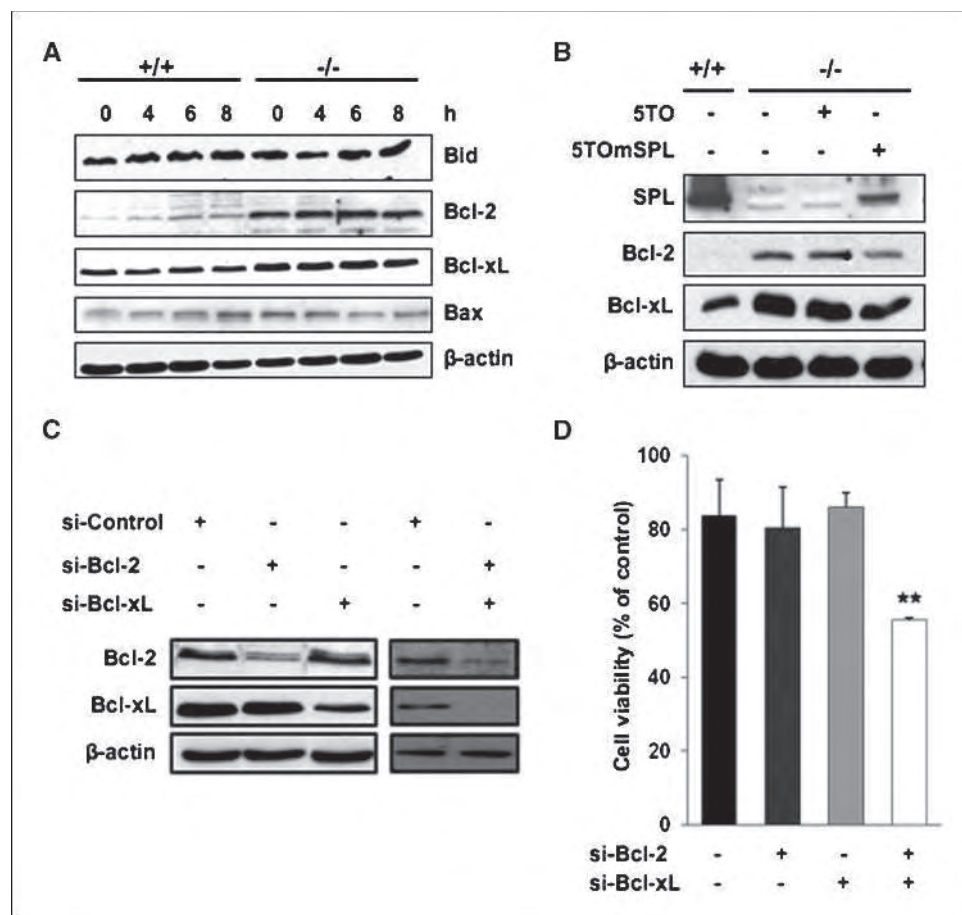
To test whether caspase activation was altered in SPL mutant cells upon doxorubicin treatment, we analyzed caspase activity by measuring cleavage of the fluorogenic tetrapeptide substrate Ac-Asp-Glu-Val-Asp-aminomethylcoumarin. Caspase activity (Fig. 3B) and processing of caspase-3 and caspase-7 as well as the cleavage of caspase-9 and the caspase substrate poly(ADP-ribose) polymerase (Fig. 3C) were strongly impaired in SPL-deficient cells following doxorubicin treatment. As shown in Fig. 3D, translocation of cytochrome *c* from mitochondria to the cytosol was also blocked in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> cells, showing the involvement of SPL in the apoptotic cascade initiated by doxorubicin with a site of action likely lying upstream of mitochondria.

**Autophagy is not altered in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> cells.** As the increase of S1P levels after SK1 overexpression was shown to stimulate autophagy and to protect cells from apoptotic death during nutrient starvation (33), we examined the effect of SPL deficiency on this phenomenon. As illustrated in Supplementary Fig. S4, starvation-induced apoptosis was reduced in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> compared with *Sgpl1*<sup>+/+</sup> cells. However, autophagy, monitored by measuring proteolysis of long-lived proteins, formation of LC3-II or LC3 translocation from the cytosol to aggregates into autophagic vacuoles, which are prerequisites for autophagosome formation and are regarded as autophagy markers (34, 35), was similar in wild-type and mutant cells. These data suggest that, under nutrient starvation, the resistance of SPL-deficient cells to apoptosis is not associated with alterations in autophagy.

**Upregulation of the expression of antiapoptotic Bcl-2 family members contributes to the chemoresistance of SPL-deficient cells.** Overexpression of prosurvival Bcl-2 proteins occurs in numerous tumors and correlates with resistance to antineoplastic drugs (36). To determine whether resistance to doxorubicin of SPL-deficient cells was accompanied with an alteration of the balance between proapoptotic and antiapoptotic members of the Bcl-2 family, the expression pattern of these proteins was investigated. A comparative Western blot analysis revealed that *Sgpl1*<sup>-/-</sup> cells displayed higher levels of both Bcl-2 and Bcl-xL than *Sgpl1*<sup>+/+</sup> cells, whereas Bid and Bax were not modified, indicating a possible contribution of Bcl-2 antiapoptotic members to the chemoresistance of SPL-deficient cells (Fig. 4A; Supplementary Fig. S3C). To

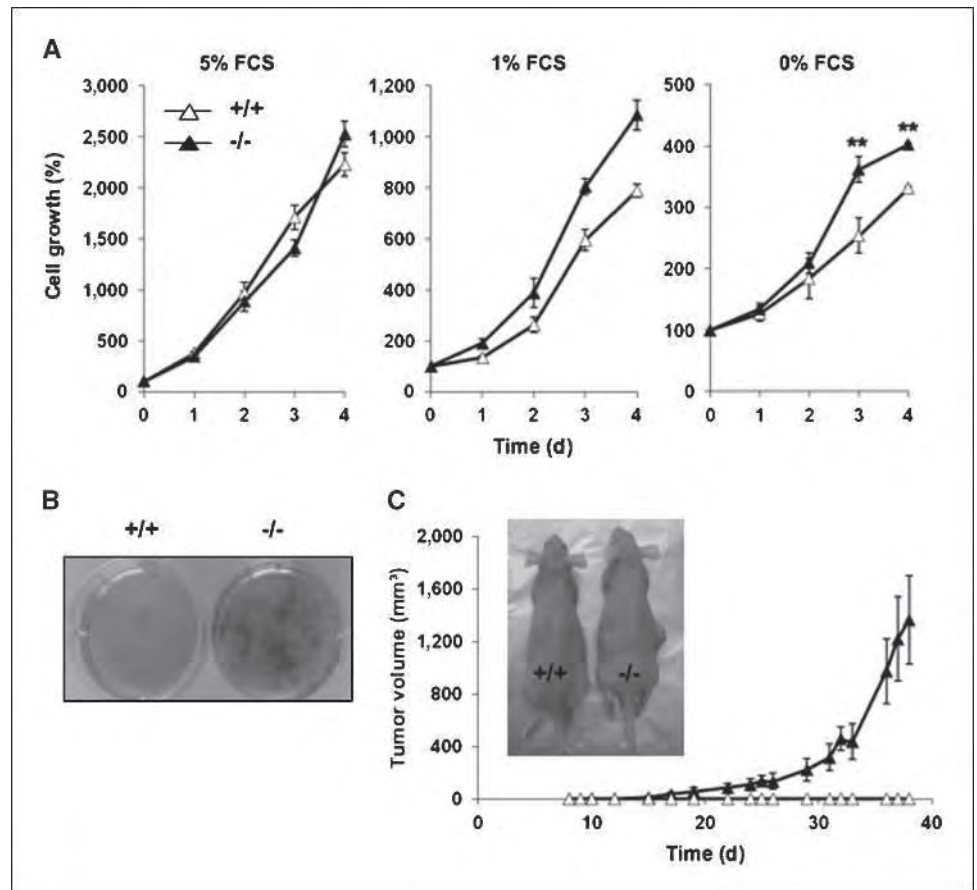
test the latter hypothesis, we investigated the expression of Bcl-2 and Bcl-xL in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> cells transiently transfected with a cDNA encoding mSPL. As shown in Fig. 4B, SPL-corrected *Sgpl1*<sup>-/-</sup> cells displayed lower levels of both Bcl-2 and Bcl-xL than mutant cells transiently transfected with an empty vector. We next employed a knockdown approach to deplete Bcl-2 and Bcl-xL either individually or in combination in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> cells. Effective downregulation of the target protein Bcl-2 or Bcl-xL was confirmed by Western blot analysis (Fig. 4C). *Sgpl1*<sup>-/-</sup> cells transfected with both Bcl-2 and Bcl-xL siRNA displayed enhanced sensitivity to doxorubicin compared with their control counterparts (Fig. 4D). Collectively, these data point to a tight regulation between the expression of Bcl-2 antiapoptotic proteins and SPL in the control of sensitivity to chemotherapeutic drugs.

**Lack of SPL expression leads to increased cell proliferation *in vitro* and oncogenesis *in vivo*.** The S1P-generating enzyme SK1 behaves as an oncogene when overexpressed in nontransformed NIH3T3 fibroblasts (13). To investigate the effect of S1P-degrading SPL on cell transformation, we analyzed the growth properties of *Sgpl1*<sup>-/-</sup> and *Sgpl1*<sup>+/+</sup> cells. We found that, in serum-free medium or in the presence of 1% serum, SPL-deficient cells exhibited higher rates of proliferation than their wild-type counterparts. In S1P-containing medium, full serum, both cell lines grew at identical rates (Fig. 5A). However, using the scratch wound closure assay, we observed that cell migration was not altered in SPL-deficient cells (data not shown). We then tested whether increased growth of *Sgpl1*<sup>-/-</sup> cells was accompanied by the ability to form colonies in



**Figure 4.** Overexpression of Bcl-2 and Bcl-xL in SPL-deficient cells. *A*, wild-type and SPL-deficient MEFs were incubated with doxorubicin (1  $\mu\text{mol/L}$ ) for the indicated times. Cell lysates (30  $\mu\text{g}$  protein) were electrophoresed to SDS-PAGE and blotted with anti-Bid, anti-Bcl-2, anti-Bcl-xL, anti-Bax, and anti- $\beta$ -actin antibodies. Representative of at least three independent experiments. *B*, Bcl-2 and Bcl-xL expression was determined in SPL-deficient cells transiently transfected with either 8  $\mu\text{g}$  of an empty vector (pcDNA5TO) or a vector containing the mSPL cDNA (pcDNA5TO-mSPL). After 48 h incubation, cell lysates were analyzed by Western blot with anti-SPL, anti-Bcl-2, and anti-Bcl-xL antibodies. *C* and *D*, SPL-deficient cells were transfected with a control siRNA or siRNA targeting Bcl-2, Bcl-xL, or both. *C*, Bcl-2 and Bcl-xL levels were evaluated by Western blotting. *D*, after 48 h of transfection with the siRNA, cells were treated with doxorubicin (1  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 h. Viability was evaluated using the MTT test. Mean  $\pm$  SE of three independent experiments.

**Figure 5.** Increased growth, colony, and tumor formation of SPL-deficient cells. **A**, wild-type and SPL-deficient cells were seeded in 24-well plates at  $3 \times 10^4$ /mL. After 16 h (time 0), the medium was removed and replaced by fresh medium containing 5%, 1%, or 0% FCS, and cells were further incubated for the indicated times. MTT assay was used to monitor growth. Representative of at least three independent experiments done in triplicate. **B**, wild-type and SPL-deficient cells were cultured on soft agar and fed with medium containing 10% FCS. Colonies were stained with MTT and photographed after 2 wk of incubation. **C**, wild-type and SPL-deficient cells were injected s.c. into nude mice (12 per group) and tumor growth was monitored regularly for 40 d.

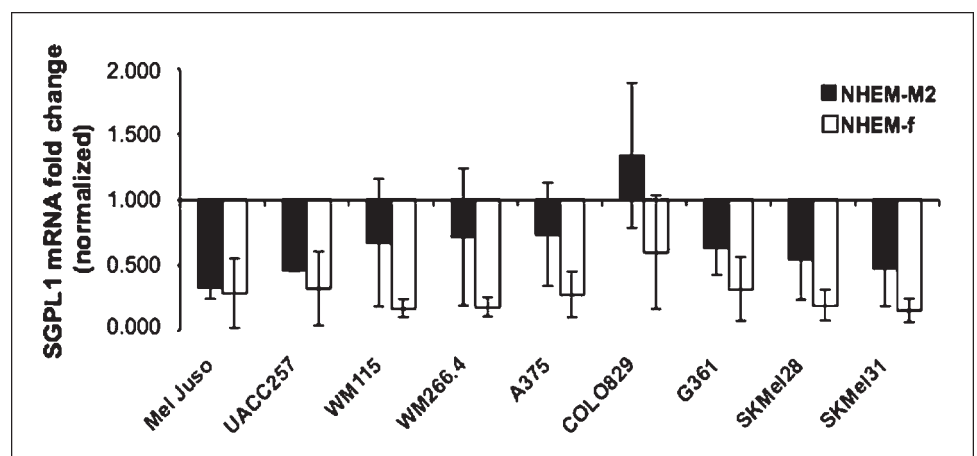


soft agar. As illustrated in Fig. 5B and Supplementary Table S2, SPL-deficient cells gave rise to numerous colonies, whereas wild-type cells showed much less anchorage-independent growth. To evaluate the *in vivo* transforming properties of SPL, we tested the ability of *Sgpl1*<sup>+/+</sup> and *Sgpl1*<sup>-/-</sup> cells to grow in immunocompromised mice. When injected s.c. in female athymic nude mice, SPL-deficient cells induced rapidly growing tumors at the site of inoculation within 15 days, whereas mice grafted with *Sgpl1*<sup>+/+</sup> cells did not develop tumors even 40 days postgraft (Fig. 5C). In all tumor-bearing mice sacrificed after 40 days, the bacterial  $\beta$ -galac-

tosidase carried in the gene trap was fully active (Supplementary Fig. S5A). Histologic analysis showed that all tumors presented high cellularity and consisted of spindle cells, some with atypical nuclei, forming fascicles highly suggestive of a fibrosarcoma (Supplementary Fig. S5B). Altogether, these data indicate that expression of a functional SPL is required for inhibition of tumorigenesis.

**Downregulation of SPL expression in melanoma cells.** Mammalian genes frequently present allelic variants that differ in their expression levels and that, in the case of tumor suppressor genes, can be of relevance for cancer susceptibility. Because the human

**Figure 6.** *SGPL1* expression in melanoma. *SGPL1* mRNA levels in human melanoma cell lines were quantified by real-time quantitative PCR. Data are mRNA fold change compared with adult (NHEM-M2) or juvenile (NHEM-f) normal human melanocytes. Mean  $\pm$  SE of two independent experiments done in duplicate.



*SGPL1* gene maps to chromosomal 10q21 and that alteration of chromosome 10 is common in human cancers including melanoma (37), we evaluated the expression of SPL in a series of invasive or metastatic melanoma cells and compared with that of melanocytes derived from healthy individuals. As shown in Fig. 6, *SGPL1* expression was significantly reduced in most melanoma cell lines tested, suggesting that this gene is downregulated during melanoma tumorigenesis.

## Discussion

S1P is considered as a tumor-promoting agent for its role in the regulation of cancer cell growth, survival, adhesion, migration, metastatic potential, and angiogenesis (2, 7). Several antitumoral therapeutic approaches targeting S1P formation and signaling have been developed including the synthesis of sphingosine kinase inhibitors (38), the targeting of S1P receptors with the immunosuppressant FTY720 (39), and the use of an anti-S1P antibody (40). By controlling S1P catabolism, SPL emerges as a novel target in the generation of sphingolipid-based therapeutics (14).

Analysis of SPL-deficient genetic models revealed that SPL is crucial for mammalian survival because SPL knockout mice displayed severe lymphopenia and developed myeloid cell hyperplasia and also significant lesions in several nonlymphoid organs (28, 41). Here, using fibroblasts generated from SPL-deficient mouse embryos, we show that complete loss of SPL activity confers resistance to apoptosis in response to chemotherapeutic agents. Of particular interest was the finding that a gene dosage effect exists in the sensitivity to anticancer drugs because the loss of a single SPL allele (as seen in heterozygous cells) resulted in partial resistance to genotoxic stress. This observation was corroborated by the fact that siRNA-mediated knockdown of SPL in control fibroblasts also led to a partial resistance to doxorubicin-induced cell death. SPL deficiency blocked apoptotic events such as the cleavage of effector caspases and the caspase substrate poly(ADP-ribose) polymerase in accordance with data showing that caspase-3 activity was increased in SPL-overexpressing cells (17, 19). Moreover, we found that the release of mitochondrial cytochrome *c* into the cytosol and the cleavage of initiator caspase-9 were impaired in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> cells, suggesting that SPL likely acts upstream of mitochondria and triggers the intrinsic apoptotic pathway.

Several Bcl-2 family proteins insert into mitochondrial membranes operating as guardians of these organelles (42). Here, we show that whereas loss of SPL activity contributes to upregulation of the oncoproteins Bcl-2 and Bcl-xL but not Bax and Bid, its restoration in SPL-deficient cells was able to diminish their expression. Moreover, double knockdown of Bcl-2 and its homologue Bcl-xL could sensitize *Sgpl1*<sup>-/-</sup> cells to the cytotoxic effect of doxorubicin. These findings identify SPL as an upstream regulator of the oncoproteins Bcl-2 and Bcl-xL that control the mitochondrial cell death pathway. They are consistent with the notion that S1P metabolism is tightly connected to the expression of Bcl-2 members. Indeed, whereas the pro-survival effect of S1P-generating enzyme SK1 has been associated with upregulation of antiapoptotic Bcl-2 proteins (21, 43), its pharmacologic inhibition resulted in cleavage of Bcl-2, a response linked to mitochondria-dependent apoptosis (38).

Bcl-2-family proteins are also capable of regulating macroautophagy by interacting with the autophagy protein Beclin 1 (44). In *Sgpl1*<sup>-/-</sup> cells, neither the expression of Beclin-1 (data not shown) nor nutrient starvation-induced autophagy were altered. These re-

sults suggest that Bcl-2 overexpression does not blunt the autophagic response in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> cells and that autophagy cannot account for the resistance of *Sgpl1*<sup>-/-</sup> cells to starvation-induced apoptosis.

All antiapoptotic Bcl-2 family members are oncoproteins and the oncogenic potential of Bcl-2 was first illustrated through its transcriptional deregulation in human follicular lymphoma (45). However, although high levels of Bcl-2 or Bcl-xL are often associated with a more aggressive malignant phenotype and mice bearing a modified *Bcl-2* transgene develop spontaneous lymphoid tumors, Bcl-2 overexpression on its own is not highly oncogenic but requires synergistic pretumorigenic lesions to increase the likelihood of malignancy (46). The present study provides evidence that combined effects of SPL loss and Bcl-2 overexpression in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> immortalized cells contribute to their ability to form colonies in soft agar and to generate solid tumors when implanted into nude mice. SPL expression may also repress cellular transformation and antagonize the oncogenic effect of the S1P-generating enzyme SK1 (13). However, whether loss of SPL affects the expression of other oncoproteins cannot be excluded. For instance, it has been shown that SPL promotes apoptosis via a p53-dependent pathway (19). The tumor suppressor p53 has been also associated to Bcl-2 because it could inactivate its antiapoptotic functions by promoting its phosphorylation (47). Moreover, p53 is inactivated in many cancers mostly through missense mutations that result in the abrogation of its activity and the acquisition of oncogenic functions (48).

S1P metabolism has also been linked to the oncogenic Ras-mediated transformation because the S1P-generating enzyme SK1 was activated in NIH3T3 cells transfected with an active mutant of Ras, whereas the transforming ability of Ras was inhibited in cells cotransfected with a dominant-negative mutant of SK1 (13). Interestingly, activation of the Ras pathway resulted in the rapid upregulation of Bcl-2 and Bcl-xL (49), and Bcl-2 and Ras mutant cooperated to give rise to malignant disease (50). Future studies are necessary to determine whether SPL loss and Bcl-2 overexpression are causally related to the Ras pathway or the expression of other oncogenes.

Our data show that reduced SPL activity results in both resistance to apoptosis and oncogenesis, suggesting that SPL could restrict tumor development. The reduced expression of SPL in solid cancers would go along such a tumor suppressor role. Indeed, we observed that *SGPL1* expression is downregulated in human melanoma. This finding is consistent with the diminished SPL expression reported on human colorectal carcinomas (19). A more in-depth analysis of the molecular mechanisms that regulate SPL expression and its effects are required to better understand its role in S1P-mediated oncogenesis.

## Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

## Acknowledgments

Received 6/17/09; revised 9/22/09; accepted 9/27/09; published OnlineFirst 11/24/09.

**Grant support:** INSERM and Paul Sabatier University, MENESR fellowship (S. Colié), and Ligue Nationale Contre le Cancer fellowship (B. Kedjouar). Chimeric mice were generated by Lexicon Genetics on a fee basis, which was covered by FWO-Vlaanderen grants G.0405.02 and G.0581.09 (P.P. Van Veldhoven).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank Drs. M. Ikeda and A. Kihara (Hokkaido University) for providing the mSPL cDNA and polyclonal antisera against mSPL and Dr. A. Bouchet, S. Carpentier, J.C. Thiers, and the staff of Plateforme Anexplo Toulouse (S. Le Gonidec, A. Desquesnes, and A. Estival) for advice and technical support.

## References

1. Zhang Y, Li X, Becker KA, Gulbins E. Ceramide-enriched membrane domains—structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2009;1788:178–83.
2. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:139–50.
3. Sabourdy F, Kedjouar B, Sorli SC, et al. Functions of sphingolipid metabolism in mammals—lessons from genetic defects. *Biochim Biophys Acta* 2008;1781:145–83.
4. Levade T, Auge N, Veldman RJ, Cuvillier O, Negre-Salvayre A, Salvayre R. Sphingolipid mediators in cardiovascular cell biology and pathology. *Circ Res* 2001;89:957–68.
5. Grassme H, Jendrossek V, Riehle A, et al. Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat Med* 2003;9:322–30.
6. Segui B, Andrieu-Abadie N, Jaffrezou JP, Benoist H, Levade T. Sphingolipids as modulators of cancer cell death: potential therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta* 2006;1758:2104–20.
7. Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. “Inside-out” signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev* 2008;60:181–95.
8. Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:397–407.
9. Alvarez SE, Milstien S, Spiegel S. Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *Trends Endocrinol Metab* 2007;18:300–7.
10. Huwiler A, Pfeilschifter J. New players on the center stage: sphingosine 1-phosphate and its receptors as drug targets. *Biochem Pharmacol* 2008;75:1893–900.
11. Shida D, Takabe K, Kapitonov D, Milstien S, Spiegel S. Targeting SphK1 as a new strategy against cancer. *Curr Drug Targets* 2008;9:662–73.
12. Vadas M, Xia P, McCaughan G, Gamble J. The role of sphingosine kinase 1 in cancer: oncogene or non-oncogene addiction? *Biochim Biophys Acta* 2008;1781:442–7.
13. Xia P, Gamble JR, Wang L, et al. An oncogenic role of sphingosine kinase. *Curr Biol* 2000;10:1527–30.
14. Bandhuvula P, Saba JD. Sphingosine-1-phosphate lyase in immunity and cancer: silencing the siren. *Trends Mol Med* 2007;13:210–7.
15. Van Veldhoven PP, Mannaerts GP. Subcellular localization and membrane topology of sphingosine-1-phosphate lyase in rat liver. *J Biol Chem* 1991;266:12502–7.
16. Ikeda M, Kihara A, Igarashi Y. Sphingosine-1-phosphate lyase SPL is an endoplasmic reticulum-resident, integral membrane protein with the pyridoxal 5'-phosphate binding domain exposed to the cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:338–43.
17. Reiss U, Oskouian B, Zhou J, et al. Sphingosine-phosphate lyase enhances stress-induced ceramide generation and apoptosis. *J Biol Chem* 2004;279:1281–90.
18. Min J, Van Veldhoven PP, Zhang L, Hanigan MH, Alexander H, Alexander S. Sphingosine-1-phosphate lyase regulates sensitivity of human cells to select chemotherapy drugs in a p38-dependent manner. *Mol Cancer Res* 2005;3:287–96.
19. Oskouian B, Sooriyakumaran P, Borowsky AD, et al. Sphingosine-1-phosphate lyase potentiates apoptosis via p53- and p38-dependent pathways and is down-regulated in colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:17384–9.
20. Bektas M, Jolly PS, Muller C, Eberle J, Spiegel S, Geilen CC. Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression. *Oncogene* 2005;24:178–87.
21. Limaye V, Li X, Hahn C, et al. Sphingosine kinase-1 enhances endothelial cell survival through a PECAM-1-dependent activation of PI-3K/Akt and regulation of Bcl-2 family members. *Blood* 2005;105:3169–77.
22. Oskouian B, Saba J. Sphingosine-1-phosphate metabolism and intestinal tumorigenesis: lipid signaling strikes again. *Cell Cycle* 2007;6:522–7.
23. Van Veldhoven PP, Gijsbers S, Mannaerts GP, Vermeesch JR, Brys V. Human sphingosine-1-phosphate lyase: cDNA cloning, functional expression studies and mapping to chromosome 10q22(1). *Biochim Biophys Acta* 2000;1487:128–34.
24. Steck PA, Ligon AH, Cheong P, Yung WK, Pershouse MA. Two tumor suppressive loci on chromosome 10 involved in human glioblastomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;12:255–61.
25. Fawole AS, Simpson DJ, Rajagopal R, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 10q is associated with earlier onset sporadic colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2002;99:829–33.
26. Wrage M, Ruusaari S, Eijk PP, et al. Genomic profiles associated with early micrometastasis in lung cancer: relevance of 4q deletion. *Clin Cancer Res* 2009;15:1566–74.
27. Zambrowicz BP, Friedrich GA, Buxton EC, Lilleberg SL, Person C, Sands AT. Disruption and sequence identification of 2,000 genes in mouse embryonic stem cells. *Nature* 1998;392:608–11.
28. Van Veldhoven PP. Sphingosine 1-phosphate lyase deficient mice. *Chem Phys Lipids* 2005;136:164–5.
29. Kihara A, Ikeda M, Kariya Y, Lee EY, Lee YM, Igarashi Y. Sphingosine-1-phosphate lyase is involved in the differentiation of F9 embryonal carcinoma cells to primitive endoderm. *J Biol Chem* 2003;278:14578–85.
30. Van Veldhoven PP. Sphingosine-1-phosphate lyase. *Methods Enzymol* 2000;311:244–54.
31. Mitra P, Payne SG, Milstien S, Spiegel S. A rapid and sensitive method to measure secretion of sphingosine-1-phosphate. *Methods Enzymol* 2007;434:257–64.
32. Vasseur S, Hoffmeister A, Garcia-Montero A, et al. p8-deficient fibroblasts grow more rapidly and are more resistant to Adriamycin-induced apoptosis. *Oncogene* 2002;21:1685–94.
33. Lavieu G, Scarlatti F, Sala G, et al. Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation. *J Biol Chem* 2006;281:8518–27.
34. Lavieu G, Scarlatti F, Sala G, et al. Sphingolipids in macroautophagy. *Methods Mol Biol* 2008;445:159–73.
35. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009;16:3–11.
36. Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2009;15:1126–32.
37. Robertson GP, Herbst RA, Nagane M, Huang HJ, Cavenee WK. The chromosome 10 monosomy common in human melanomas results from loss of two separate tumor suppressor loci. *Cancer Res* 1999;59:3596–601.
38. Paugh SW, Paugh BS, Rahmani M, et al. A selective sphingosine kinase 1 inhibitor integrates multiple molecular therapeutic targets in human leukemia. *Blood* 2008;112:1382–91.
39. LaMontagne K, Littlewood-Evans A, Schnell C, et al. Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization. *Cancer Res* 2006;66:221–31.
40. Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, et al. Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell* 2006;9:225–38.
41. Vogel P, Donoviel MS, Read R, et al. Incomplete inhibition of sphingosine 1-phosphate lyase modulates immune system function yet prevents early lethality and non-lymphoid lesions. *PLoS ONE* 2009;4:e4112.
42. Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 2008;27:6398–406.
43. Li QF, Huang WR, Duan HF, Wang H, Wu CT, Wang LS. Sphingosine kinase-1 mediates BCR/ABL-induced upregulation of Mcl-1 in chronic myeloid leukemia cells. *Oncogene* 2007;26:7904–8.
44. Pattingre S, Tassa A, Qu X, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 2005;122:927–39.
45. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985;228:1440–3.
46. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003;22:8590–607.
47. Thomas A, Giesler T, White E. p53 mediates bcl-2 phosphorylation and apoptosis via activation of the Cdc42/JNK1 pathway. *Oncogene* 2000;19:5259–69.
48. Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 2000;60:6788–93.
49. Kinoshita T, Yokota T, Arai K, Miyajima A. Regulation of Bcl-2 expression by oncogenic Ras protein in hematopoietic cells. *Oncogene* 1995;10:2207–12.
50. Omidvar N, Kogan S, Beurlet S, et al. BCL-2 and mutant NRAS interact physically and functionally in a mouse model of progressive myelodysplasia. *Cancer Res* 2007;67:11657–67.

**ARTICLE :**

**Non-lysosomal beta-glucosidase GBA2 as a novel source of glucosylceramide catabolism involved in the regulation of melanoma growth.**

# The nonlysosomal $\beta$ -glucosidase GBA2 promotes endoplasmic reticulum stress and impairs tumorigenicity of human melanoma cells

Sonia-Caroline Sorli,<sup>\*,†,1</sup> Sandra Colié,<sup>\*,†,1</sup> Virginie Albinet,<sup>\*,†</sup> Alexandre Dubrac,<sup>\*,†</sup> Christian Touriol,<sup>\*,†</sup> Nicolas Guilbaud,<sup>‡</sup> Carmen Bedia,<sup>§</sup> Gemma Fabriàs,<sup>§</sup> Josefina Casas,<sup>§</sup> Bruno Ségui,<sup>\*,†</sup> Thierry Levade,<sup>\*,†,||,2</sup> and Nathalie Andrieu-Abadie<sup>\*,†,2</sup>

\*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité Mixte de Recherche (UMR) 1037, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Toulouse, France; <sup>†</sup>Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France; <sup>‡</sup>Centre de Recherche en Oncologie Expérimentale, Institut de Recherche Pierre-Fabre, Toulouse, France; <sup>§</sup>Department of Biomedical Chemistry, Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), Barcelona, Spain; and <sup>||</sup>Laboratoire de Biochimie Métabolique, Centre Hospitalier Universitaire Toulouse, Toulouse, France

**ABSTRACT** Glycosphingolipids, which are abundant at the surface of melanoma cells, play crucial roles in tumor progression. We investigated whether a newly described glycosphingolipid hydrolase, encoded by the *GBA2* gene, can modulate human melanoma cell growth and death. *GBA2* expression was quantified on melanoma cells by RT-qPCR. The antiproliferative effects of *GBA2* were assessed in tumor cells expressing inducible *GBA2* and in established melanoma xenografts. As a control an inducible catalytically inactive *GBA2* mutant was generated. Sphingolipid levels were monitored by mass spectrometry; unfolded protein response (UPR) and apoptosis were assessed by Western blot and flow cytometry analyses, respectively. We report that *GBA2* is down-regulated in melanoma; inducible expression of *GBA2* affects endogenous sphingolipid metabolism by promoting glucosylceramide degradation (decrease by 78%) and ceramide generation; this is followed by a UPR that causes apoptosis, subsequent decreased anchorage-independent cell growth, and reduced *in vivo* tumor growth (by 40%); and all these events are abrogated when expressing a catalytically inactive *GBA2*. This study documents for the first time the antitumor activity of *GBA2* and provides evidence for the role of nonlysosomal glucosylceramide breakdown as a source of bioactive ceramide and a mechanistic link between glycolipid catabolism and the UPR/death response of melanoma cells.—Sorli, S.-C., Colié, S., Albinet, V., Dubrac, A., Touriol, C., Guilbaud, N., Bedia, C., Fabriàs, G., Casas, J., Ségui, B., Levade, T.,

Andrieu-Abadie, N. The nonlysosomal  $\beta$ -glucosidase *GBA2* promotes endoplasmic reticulum stress and impairs tumorigenicity of human melanoma cells. *FASEB J.* 27, 000–000 (2013). [www.fasebj.org](http://www.fasebj.org)

*Key Words:* glycosylceramidase • unfolded protein response • cancer cell death • glucosylceramide

SPHINGOLIPIDS (SLs), WHICH are essential components of the plasma membrane of eukaryotic cells, lie in a key position to modulate the pathways of transmembrane signaling and allow the cell to adapt to environmental stresses (1). In solid cancers and hematologic malignancies, ceramide has attracted a particular interest because it behaves as an antiproliferative and proapoptotic SL metabolite (2, 3). By facilitating elimination of tumor cells through increased sensitivity to conventional treatments and/or by overcoming their resistance, manipulation of ceramide levels has thus emerged as a potential tool in the anticancer arsenal (2–4).

However, the conversion of ceramide to various SLs, including sphingosine 1-phosphate, sphingomyelin, and glycosphingolipids (GSLs), can modulate or counteract the cytotoxic signal induced by ceramide itself (4). A well-documented example is the conversion of ceramide to glucosylceramide (GlcCer), catalyzed by GlcCer synthase (GCS) on the cytosolic face of the Golgi apparatus (5). Indeed, enhanced glucosylation of ceramide contributes to the multidrug resistance phe-

Abbreviations: CBE, conduritol B epoxide; eIF2 $\alpha$ , eukaryotic initiation factor-2 subunit  $\alpha$ ; ER, endoplasmic reticulum; FCS, fetal calf serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; GBA, acid  $\beta$ -glucosidase; GCS, glucosylceramide synthase; GD, Gaucher disease; GlcCer, glucosylceramide; GSL, glycosphingolipid; HA, hemagglutinin; IRE1 $\alpha$ , inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$ ; NBD, nitrobenzoxadiazole; PERK, PKR-like ER kinase; PI, propidium iodide; SL, sphingolipid; Tet, tetracycline; UPR, unfolded protein response; wt, wild-type

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Correspondence: Inserm UMR1037, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, CHU Rangueil BP84225, 31432 Toulouse cedex 4, France. E-mail: N.A.-A., [nathalie.andrieu@inserm.fr](mailto:nathalie.andrieu@inserm.fr); T.L., [thierry.levade@inserm.fr](mailto:thierry.levade@inserm.fr)

doi: 10.1096/fj.12-215152

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.



notype in numerous human cancer cells (6, 7). Accordingly, as compared to their drug-sensitive counterparts, chemotherapeutic drug-resistant cancer cell lines accumulate GlcCer (8). The resistance can be reversed by inhibiting GlcCer synthesis with GCS antisense oligonucleotides (9) or by using structural analogs of GlcCer, such as P-drugs (10). Furthermore, GlcCer is the precursor for plasma membrane-located sialic acid-containing GSLs, known as gangliosides, which are critical players in tumor progression by controlling cancer cell growth, adhesion, and motility (11) as well as epithelial-mesenchymal transition (12). Interestingly, in melanoma cells, inhibition of GlcCer synthesis by iminosugars led to delayed tumor development (13). Similarly, pharmacologic depletion of GSLs in melanoma cells was associated with poor tumorigenic capacity when injected into mice (14). The same observation was reported for MB4 murine melanoma cells transfected with antisense targeting GCS (15). Several gangliosides are highly expressed at the surface of human melanoma cells and have been suggested as tumor-specific markers for melanic tumors and as targets for immunotherapy (16). Altogether, these findings suggest that limiting the synthesis of GlcCer or conversely promoting its degradation to accumulate proapoptotic ceramide could be a promising therapeutic approach to halt melanoma progression.

The main catabolic pathway for GlcCer takes place in the lysosomes, where acid  $\beta$ -glucosidase 1 (GBA1), also called lysosomal glucosylceramidase, catalyzes the cleavage of the  $\beta$ -glucosyl linkage between ceramide and glucose. GBA1 activity is deficient in Gaucher disease (GD), the most common inherited lysosomal storage disorder, characterized by GlcCer accumulation in lysosomes of laden tissue macrophages (17). However, as GlcCer storage is not observed in other cell types, the existence of some alternative pathway for GlcCer catabolism has been speculated (18). Two nonlysosomal  $\beta$ -glucosidases, termed GBA2 (19) and GBA3, also known as Klotho-related protein (20), have been identified. Whereas mRNA expression of the latter is downregulated in renal cell carcinoma tissues compared to nontumor regions (21), the expression and role of GBA2 in tumor cell growth have never been studied.

GBA2 was described as a membrane-bound enzyme located in the endoplasmic reticulum (ER; ref. 22) but also at or close to the cell surface (19) that cleaves the  $\beta$ -glucose-sphingosine linkage present in GlcCer. While GBA2 deficiency in mice resulted in impaired spermatogenesis associated with GlcCer accumulation in the ER (22), no disorder related to defective GBA2 has been described so far in humans.

To assess the yet undetermined role of GBA2 on melanoma growth, we performed transcriptomic studies on various human melanoma cell lines from invasive and metastatic stages. Here we report a lower expression of GBA2 in melanoma cancer cells as compared with normal melanocytes. Then we show that expression of active GBA2 in tumor cells leads to increased levels of ceramide, ER-specific unfolded protein re-

sponse (UPR), apoptosis, and impaired melanoma growth. Our findings demonstrate that the catabolism of GlcCer into ceramide by the nonlysosomal  $\beta$ -glucosidase GBA2 may represent a novel approach for therapeutic intervention in melanoma.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of plasmid DNA and cell transfection

The whole coding sequence of human GBA2 cDNA was amplified by a 2-step PCR strategy using Phusion DNA polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland), cDNA from normal human cells as template, and primers containing appropriate restriction sites and hemagglutinin (HA)-tag coding sequence (sense 5'-ggaattccgccatcgaggatcatggg and antisense 5'-gcgccgctcaagcgtaatctggaacatcgtatgggtactctgggct). The amplification product was cloned into the pcDNA5/TO vector (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The pcDNA5/TO-hGBA2 plasmid was mutated using the QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Massy, France) with the primers 5'-cgatttgctaccttcaggccaggagta and 5'-gtactcctggcctgaaggtagcacaatcg to introduce the E527Q mutation. All constructs were validated by sequencing. pcDNA6/TR plasmid (Invitrogen) was transfected into A375 cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Stable transfectants were selected for their resistance to 250  $\mu$ g/ml hygromycin B before transfection with wild-type (wt) or mutated pcDNA5/TO-hGBA2 construct. A375-GBA2 clones were then selected using 3  $\mu$ g/ml blasticidin.

### Cell culture

Human melanoma cell lines were grown either in RPMI (COLO-829, G361, MEL-JUSO, UACC-257, WM-115 and WM-266.4) or DMEM (A375, IC8, SK-MEL28, and SK-MEL31) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) in the presence of 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere at 37°C. A375, SK-MEL28, SK-MEL31, WM-115 and WM-266.4 cells were obtained from American Type Culture Collection (LGC, Molsheim, France). COLO-829 cells were a gift from Prof. R. Marais (University of Manchester, Manchester, UK). G361, MEL-JUSO, and UACC-257 cell lines were from Pierre Fabre Laboratories (Toulouse, France), and IC8 cells were from Dr. J. Portoukalian (University of Lyon 1, Lyon, France).

### Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from nonconfluent human melanoma cell lines or normal epidermal melanocytes derived from adult skin NHEM-M2 or juvenile foreskin NHEM-B (PromoCell, Heidelberg, Germany), and quantitative RT-PCR was performed in triplicate as reported (23). GBA2 mRNA expression was analyzed after normalization to that of TBP, TFRC, and  $\beta$ -actin genes and using the  $\Delta\Delta C$  comparative method. For ASNS, ATF4, ATF5, BIP, CHOP, DNAJB9, EDEM, GADD34, and HERP mRNA quantification, primer sequences are described in Supplemental Material.

### Analysis of XBP-1 mRNA splicing

Total RNA from A375-GBA2 cells was isolated with Trizol reagent (Invitrogen) for RT-PCR analysis. Primers spanning the XBP-1 splice junction (forward 5'-ctggaacagcaagtggtaga and reverse 5'-ctctccaggctggcagg) were used to amplify un-

spliced and spliced mRNA. PCR products were separated by electrophoresis on 4% agarose gel and visualized by SybrGreen staining (Invitrogen).

### siRNA transfections

Transient interference was achieved by a pool of 4 siRNAs specific for ATF6, inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$  (IRE1 $\alpha$ ), or PKR-like ER kinase (PERK; ON-TARGETplus SMARTpool; Dharmacon; Thermo Fisher, Brebières, France) or aleatory sequence scrambled siRNA. siRNAs were transfected alone or in combination into A375-GBA2 cells using Interferin (Polyplus Transfection, Illkirch, France) as described by the manufacturer. After 24 h of transfection, 1  $\mu$ g/ml doxycycline was added to the medium, and cells were incubated for 48 h before evaluation of caspase activity.

### Immunofluorescence microscopy

A375-GBA2 cells were seeded on glass coverslips at a density of  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. After a 48 h incubation in the presence or absence of 1  $\mu$ g/ml doxycycline, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, washed, and permeabilized using 0.1% Triton X-100. Unspecific sites were saturated with 10% FCS, and probing with 10  $\mu$ g/ml anti-HA (Cell Signaling Technology; Ozyme, Saint-Quentin Fallavier, France) or 1  $\mu$ g/ml anti-GBA2 (Sigma, L'isle-d'Abeau, France) antibody was performed. HA and GBA2 expression were visualized by Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (1:250) and Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG (1:500), respectively. Coverslips were mounted using Prolong Gold AntiFade reagent (Invitrogen), and cells were examined using a fluorescence-equipped Olympus microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

### GBA2 enzymatic assay

Prior to assay, GBA1 was inhibited or not by incubating cells or tumor lysates with 1 mM conduritol B epoxide (CBE; Calbiochem, San Diego, CA, USA) at 4°C for 30 min. GBA2 enzymatic activity was then determined using an artificial fluorogenic substrate (19).

### In situ GBA2 activity

Melanoma cells were seeded at a density of  $2.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in DMEM containing 5% FCS supplemented or not with 1  $\mu$ g/ml doxycycline for 48h. Prior to assay, the medium was replaced by serum-free medium, and GBA1 activity was inhibited by a 30 min-incubation with 1 mM CBE. Cells were then incubated for 2 h at 37°C with 2  $\mu$ M C<sub>6</sub>-nitrobenzoxadiazole (NBD)-GlcCer (Sigma) solubilized in ethanol. The reaction was stopped by scraping and harvesting the cells. Lipids were extracted, resolved by analytical thin-layer chromatography, and quantified (19).

### Mass spectrometric analysis of lipids

SLs were quantified by ultraperformance liquid chromatography, coupled to high-resolution electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TOF; Waters, Milford, MA, USA; ref 24).

### Cytotoxicity and caspase assays and flow cytometry analyses

The viability of cells seeded at a density of  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>, in medium containing hygromycin B, blasticidin, and 1% FCS, supplemented or not with 1  $\mu$ g/ml doxycycline, was

assessed using the tetrazolium-based 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (23).

After stimulation with 1  $\mu$ g/ml doxycycline for 48 h, caspase-3/7 activity was measured with a homogeneous luminescent assay (Caspase-Glo; Promega, Charbonnières-les-Bains, France). The luminescence signal was normalized to absolute cell numbers that were counted in parallel using the CellTiter 96 AQueous One Solution cell proliferation assay (Promega).

To monitor hypodiploidy, cells seeded as above were permeabilized in 70% ethanol overnight at -20°C, treated for 30 min at 37°C with 1  $\mu$ g/ml RNase (Invitrogen), and DNA was stained using 0.1 mg/ml of propidium iodide (PI). DNA content was quantified by flow cytometry. Phosphatidylserine externalization was studied by staining the cells with annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) and PI as described previously (25).

### Western blot analyses

Cells were lysed in Laemmli buffer and immunoblotted with anti-BiP, anti-eukaryotic initiation factor-2 subunit  $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ), anti-p-eIF2 $\alpha$ , anti-HA, anti-IRE1 $\alpha$ , anti-PARP, anti-PERK, anti-p-PERK (Cell Signaling), or anti-GBA2 (Sigma) antibody. The protein signal was normalized using an anti- $\beta$ -actin monoclonal antibody (Cell Signaling). Immunoreactive proteins were detected with enhanced chemiluminescence (Pierce, Rockford, IL, USA).

### Tumor growth

Animal experiments were conducted in accordance with the 86/609/EC European directive, and our protocol was approved by the Regional Ethics Committee of Midi-Pyrénées for Animal Experimentation. A375-GBA2 cells ( $5 \times 10^6$ ) were injected subcutaneously into the flank of 5-wk-old female nude mice (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France). When tumors reached a volume of 50-100 mm<sup>3</sup>, GBA2 expression was induced or not by adding fresh 2 mg/ml doxycycline in the drinking water every day. Animal body weight and tumor volumes were measured 3 $\times$ /wk. Tumors were removed 38 d postinjection, weighed, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -70°C for subsequent GBA2 enzymatic assay.

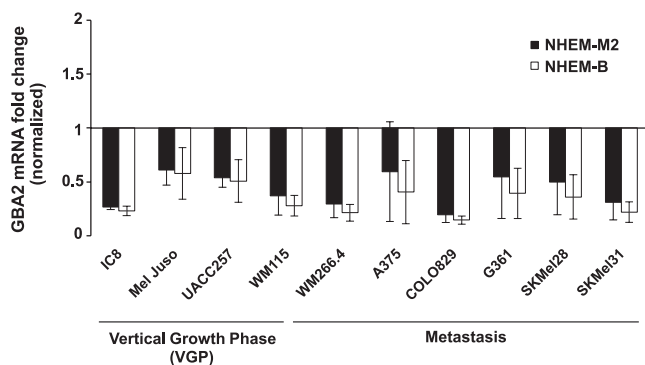
### Statistical analyses

Results are expressed as means  $\pm$  SE. Statistical analyses were performed using Student's *t* test (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA); values of *P* < 0.05 were considered significant. For *in vivo* experiments, a 2-way ANOVA was used.

## RESULTS

### Melanoma cells show down-regulation of GBA2

Because GlcCer-based gangliosides are widely expressed in melanoma (26), we assessed the expression pattern of the gene encoding for the nonlysosomal GlcCer-degrading enzyme GBA2 in healthy melanocytes and in a series of invasive or metastatic melanoma cells. As shown in **Fig. 1**, all melanoma cell lines tested exhibited a low level of GBA2 mRNA as compared with normal cells, suggesting that this gene is down-regulated during melanoma tumorigenesis. No difference



**Figure 1.** GBA2 expression in melanoma cells. GBA2 mRNA in human melanoma cell lines was quantified by quantitative RT-PCR and expressed as fold change over the levels in adult (NHEM-M2) or juvenile (NHEM-B) normal human melanocytes (means  $\pm$  SE of 3 independent experiments performed in duplicate).

between invasive and metastatic cell lines was noticed. In addition, we observed that the GBA2 enzyme activity in melanoma cells was lower than in melanocytes ( $21.8 \pm 2.9$  and  $17.9 \pm 2.1$  nmol/h/mg in 5 invasive [VGP] and 8 metastatic cell lines, respectively, as compared to 31.5 nmol/h/mg in the Melan-a cell line).

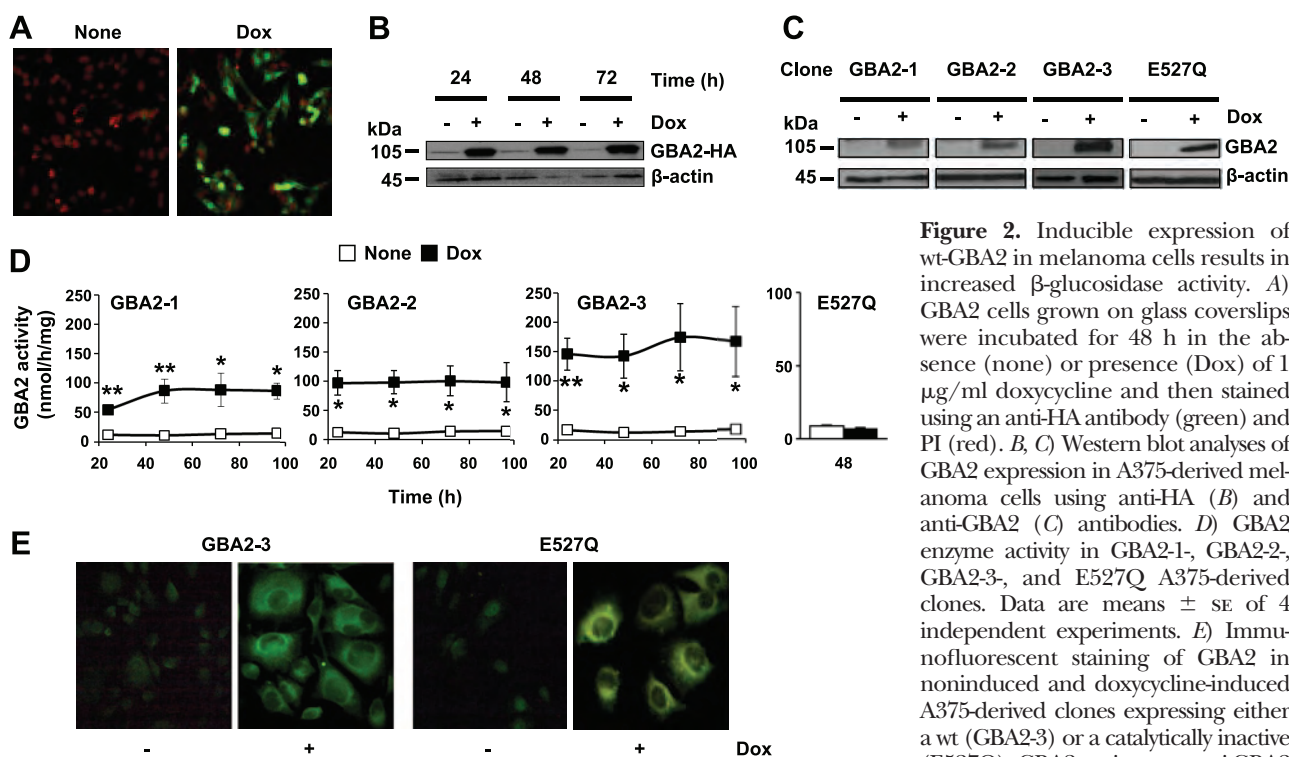
### Nonlysosomal $\beta$ -glucosidase GBA2 leads to ceramide formation

To investigate how GBA2 affects SL metabolism in melanoma, we first generated a doxycycline-inducible GBA2 construct, which produces a C-terminal HA-

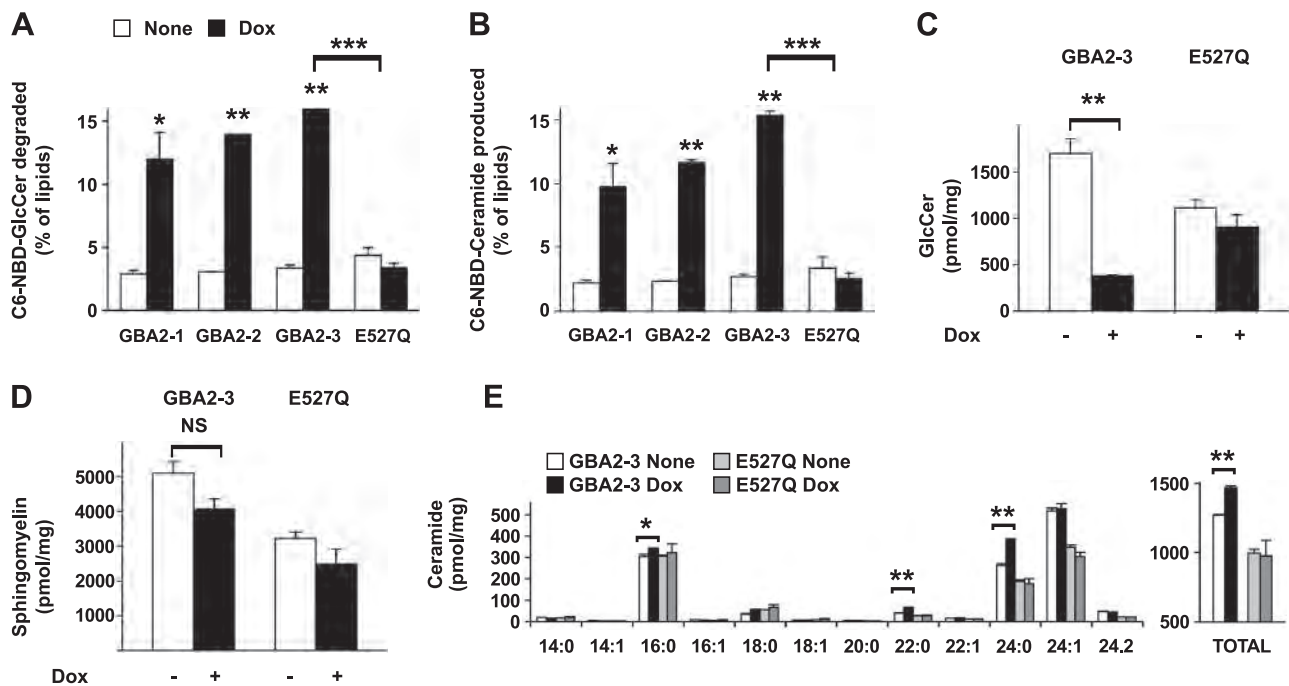
tagged human enzyme under the control of a tetracycline (Tet) operator and a minimal cytomegalovirus (CMV) promoter. As shown by immunocytochemistry (Fig. 2A) and immunoblotting (Fig. 2B) against the HA tag, solely detecting the overexpressed protein, A375 human melanoma cells exhibited a doxycycline-dependent induction of the GBA2-HA protein, already 24 h after treatment. A selection strategy based on individual clones was carried out to obtain clones with weak, modest, and high inducible expression of GBA2 on addition of doxycycline, termed GBA2-1, GBA2-2, and GBA2-3, respectively (Fig. 2C). The enzymatic activity of GBA2, determined on cell lysates in the presence of CBE, a potent GBA1 inhibitor, increased after doxycycline induction and was maintained until 96 h post-treatment. This activity correlated with the expression level of GBA2 in the established clones (Fig. 2D).

As a specific control of GBA2 activation, we generated an inducible catalytically inactive GBA2. This was accomplished through site-directed mutagenesis by substituting glutamic acid residue Glu527 of the human GBA2 to glutamine (this residue was found to be highly conserved from multialignment analyses; ref. 27). When expressed at high levels in A375-TetR clones, the doxycycline-induced GBA2(E527Q) mutant produced virtually no enzymatic activity (Fig. 2D), whereas neither its protein expression (Fig. 2C) nor its subcellular localization (Fig. 2E) were affected. Indeed, a reticular, perinuclear staining pattern characteristic of the ER was observed in cells expressing the wt or mutated form of GBA2.

To address the possible involvement of GBA2 in ceramide formation, we first measured its *in situ* enzy-



**Figure 2.** Inducible expression of wt-GBA2 in melanoma cells results in increased  $\beta$ -glucosidase activity. *A*) GBA2 cells grown on glass coverslips were incubated for 48 h in the absence (none) or presence (Dox) of 1  $\mu$ g/ml doxycycline and then stained using an anti-HA antibody (green) and PI (red). *B, C*) Western blot analyses of GBA2 expression in A375-derived melanoma cells using anti-HA (*B*) and anti-GBA2 (*C*) antibodies. *D*) GBA2 enzyme activity in GBA2-1-, GBA2-2-, GBA2-3-, and E527Q A375-derived clones. Data are means  $\pm$  SE of 4 independent experiments. *E*) Immunofluorescent staining of GBA2 in noninduced and doxycycline-induced A375-derived clones expressing either a wt (GBA2-3) or a catalytically inactive (E527Q) GBA2, using an anti-GBA2 antibody.



**Figure 3.** Inducible expression of wt-GBA2 in melanoma cells leads to enhanced GlcCer breakdown and ceramide formation. *A, B*) A375-derived clones were incubated for 48 h in the absence or presence of 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  doxycycline.  $\text{C}_6\text{-NBD-GlcCer}$  (2  $\mu\text{M}$ ) was added to the cells for 2 h. Fluorescent GlcCer (*A*) and ceramide (*B*) were quantified. Results are expressed as percentage of total fluorescent lipids (means  $\pm$  SE of 2 independent experiments). *C-E*) A375-derived clones, expressing either a wt (GBA2-3) or a catalytically inactive (E527Q) GBA2, were incubated for 24 h in the absence or presence of doxycycline. Cellular lipids were extracted and SL levels were quantified by LC/MS. GlcCer (*C*), sphingomyelin (*D*), and individual and total ceramide species (*E*) are expressed in picomoles per nanogram of protein (means  $\pm$  SE of 2 independent experiments).

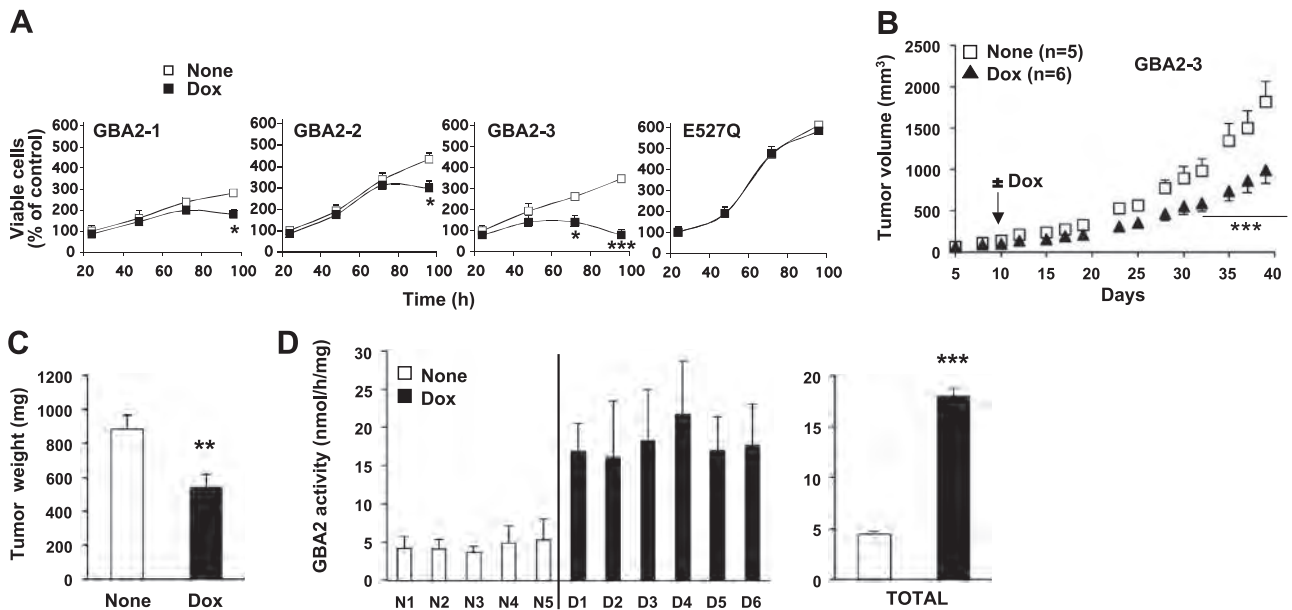
matic activity by incubating intact living cells with a fluorescent analog of GlcCer that is converted into fluorescent ceramide. At 48 h after doxycycline treatment, expression of GBA2 resulted in a significantly increased degradation of fluorescent GlcCer (**Fig. 3A**) together with a significant raise in the amount of  $\text{C}_6\text{-NBD-ceramide}$  (**Fig. 3B**) in all 3 wt-GBA2-expressing A375-derived clones but not in GBA2(E527Q) variant. Moreover, measurement of endogenous SL levels by LC/MS, in doxycycline-induced clones revealed that GBA2 caused a dramatic decrease in GlcCer content (**Fig. 3C**), whereas sphingomyelin levels remained unaltered (**Fig. 3D**). This effect was associated with a significant increase of ceramide levels, especially those of 16- and 24-carbon chain length (**Fig. 3E**), from 24 h onward (**Supplemental Fig. S1A**) without affecting dihydroceramide content (**Supplemental Fig. S1B**). Interestingly, expression of the E527Q mutant had no effect on GlcCer degradation (**Fig. 3C**) and its conversion into ceramide (**Fig. 3E**), demonstrating that the non-lysosomal glucosylceramidase acts as a novel source of ceramide production in melanoma cells.

### GBA2 inhibits melanoma cell proliferation and *in vivo* growth of established melanoma tumors

To assess the biological function of GBA2 in melanoma cells, A375 clones constitutively expressing the Tet repressor alone (A375-TetR) or GBA2 were grown in 1% serum with or without doxycycline for 4 d, and

viable cells were counted. Whereas doxycycline treatment did not significantly change growth of control A375-TetR clones (data not shown) nor that of GBA2(E527Q) variants, it resulted in inhibition of melanoma cell proliferation in wt-GBA2 clones (**Fig. 4A**), demonstrating that expression of a functional GBA2 is required to inhibit melanoma cell growth. Moreover, the inhibitory effect of doxycycline on melanoma clones correlated with the degree of overexpressed GBA2 activity, so that the number of viable GBA2-3 cells (having the highest activity) at 96 h was the same as that at 24 h. The profound inhibitory effect induced by GBA2 on melanoma proliferation was also observed on anchorage-independent growth of GBA2-3 cells, as revealed by the absence of colonies after doxycycline induction (**Supplemental Fig. S2**).

To test whether GBA2 overexpression could result in the suppression of tumor growth *in vivo*, A375-derived GBA2-3 cells were subcutaneously injected into the flank of female athymic nude mice, and tumor volumes were measured over 38 d. As expected, mice injected with GBA2-3 melanoma cells developed large tumors at the site of inoculation. The switch was triggered by giving the animals, harboring an established tumor, doxycycline in their drinking water. Under these conditions, the average tumor volumes (**Fig. 4B**) and weights (**Fig. 4C**) of GBA2-3-injected mice were significantly reduced. As shown in **Fig. 4D**, doxycycline induced a strong increase in GBA2 enzymatic activity in



**Figure 4.** Inducible expression of wt-GBA2 reduces melanoma cell growth. *A*) Viability of A375-derived clones incubated for the indicated times in the absence or presence of 1  $\mu$ g/ml doxycycline. Results are expressed as percentage of the value determined at 24 h in the absence of doxycycline (means  $\pm$  SE of 2 to 3 independent experiments). *B–D*) GBA2-3 cells were subcutaneously injected into nude mice. When the tumors were measurable, 2 mg/ml doxycycline was added or not in the drinking water. *B*) Tumor growth was monitored every 2 d. *C, D*) At 38 d after implantation of GBA2-3 cells, tumors were excised and weighed (*C*), and GBA2 enzyme activity was evaluated in tumor lysates (*D*). Data are means  $\pm$  SE of triplicate determination. Right panel: mean values measured in individual tumors.

all tumors of treated mice, demonstrating that expression of GBA2 can inhibit melanoma tumorigenesis *in vivo*.

#### GBA2 triggers an ER-specific UPR and apoptosis in human melanoma cells

Because GBA2 is a resident enzyme of the ER (22) and because recent evidence indicates that increased conversion of ceramide into GlcCer-reduced ER stress in pancreatic  $\beta$ -cells (28), we hypothesized that GBA2 induction and subsequent ceramide formation might affect ER homeostasis in melanoma cells. Induction of GBA2 in doxycycline-stimulated GBA2-3 cells increased expression of several ER stress marker genes, including that encoding BiP, a chaperone protein classically induced during UPR (Fig. 5A). Similarly, GBA2 also activated the unconventional XBP-1 mRNA splicing (Fig. 5B) mediated by IRE1 endonuclease activity, leading to the expression of the active form of XBP-1. This XBP-1 spliced form is one of the several factors responsible for UPR, including IRE1 $\alpha$  and other known mammalian sensors (29).

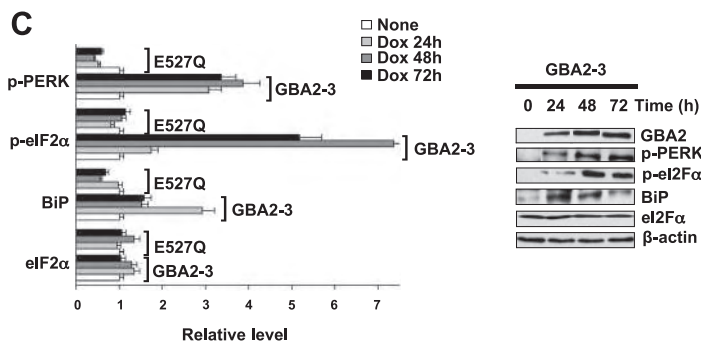
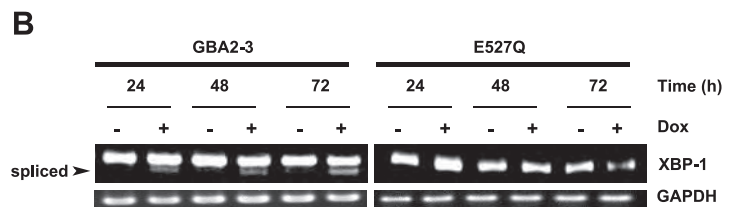
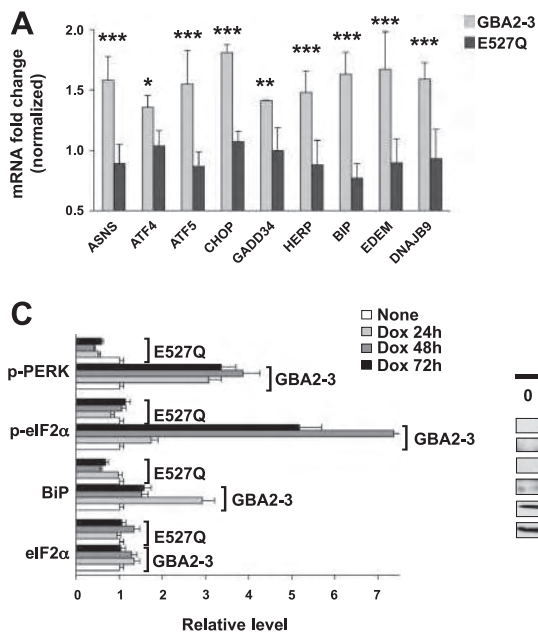
Of note, the expression of DNAJB9 and EDEM, 2 XBP-1-dependent genes involved in ER protein maturation or ER-associated degradation, respectively, was induced in doxycycline-stimulated GBA2-3 cells (Fig. 5A). Moreover, GBA2 caused activation of PERK, another ER stress sensor, as evidenced by its autophosphorylation as well as by the phosphorylation of its main substrate, eIF2 $\alpha$  (Fig. 5C). This event was associated with an increased expression of ATF4 and ATF5

transcription factors and of downstream targets of ATF4, including ASNS, BiP, HERP, GADD34, and CHOP (Fig. 5A).

Remarkably, Fig. 5 shows that all these effects were absent in GBA2(E527Q) cells in which GBA2 is expressed in the ER but in a catalytically inactive form (Fig. 2), confirming that GBA2 plays a significant role in the regulation of UPR.

Depending on the duration or severity of ER stress, activation of the UPR can promote cell survival or lead to apoptotic cell death. In doxycycline-stimulated GBA2-3 cells, our data suggest that induction of GBA2 was associated with a decrease in melanoma cell viability (Fig. 4A) and an ER stress maintained over time (Fig. 5B, C). Moreover, ceramide is known to trigger apoptosis of cells in which it accumulates (3). To test the ability of GBA2 to modulate apoptosis in melanoma cells, cell cycle of A375-derived GBA2-3 melanoma cells was evaluated by flow cytometry analysis. As shown in Fig. 6A (and Supplemental Fig. S3), the number of cells with hypodiploid DNA content, which corresponds to apoptotic cells with degraded DNA, was significantly higher in cells overexpressing GBA2 after treatment with doxycycline. Similarly, an increased proportion of annexin-V-positive cells (Fig. 6B), as well as an increased activity of effector caspases (Fig. 6C) and cleavage of the apoptosis-associated protein PARP (Fig. 6D), considered as some of the major biochemical hallmarks of apoptosis, were observed in doxycycline-treated GBA2-3 cells as compared with noninduced cells.

Of note, all these events were absent in doxycycline-treated GBA2(E527Q) variants (Fig. 6B–D), demon-



**Figure 5.** wt-GBA2 elicits ER stress in melanoma cells. A375-derived clones, expressing either a wt (GBA2-3) or catalytically inactive (E527Q) GBA2, were incubated for the indicated times in the absence or presence of 1  $\mu$ g/ml doxycycline. *A*) After 24 h induction, mRNA levels were determined by quantitative RT-PCR and normalized to S16 ribosomal protein mRNA. Numbers indicate the mean  $\pm$  SE fold increase relative to non-induced cells. *B*) Splicing of XBP-1 was assessed by RT-PCR. *C*) Equal amounts of cell lysates were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies and reprobed for  $\beta$ -actin to ensure equal loading. Left: levels of BiP, p-eIF2 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$ , and p-PERK normalized to  $\beta$ -actin and relative to noninduced cells. Right: representative immunoblot for GBA2-3 cells.

strating the ability of active GBA2 to modulate the apoptotic death of melanoma cells.

We next investigated whether activation of ER stress is causally involved in the stimulation of apoptosis in response to GBA2 induction in melanoma cells. Data indicated that silencing ATF6, IRE1 $\alpha$ , or PERK (Fig. 6E) significantly reduced GBA2-induced caspase activation (Fig. 6F). Combined down-regulation of the 3 arms of ER stress pathways was required to completely abrogate this effect. Altogether, these findings suggest that the GBA2-mediated hydrolysis of GlcCer causes ER stress which in turn results in apoptosis of melanoma cells.

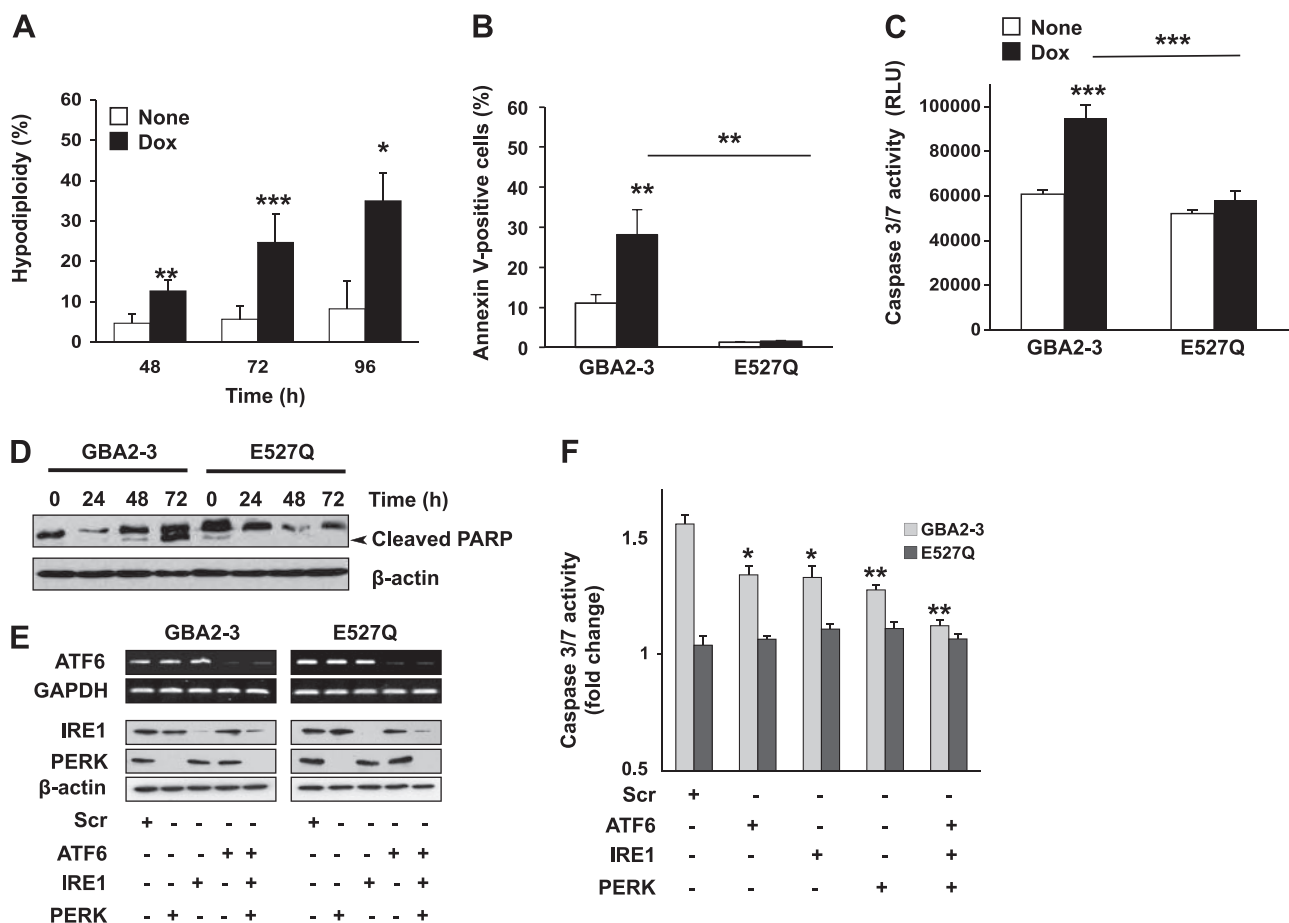
## DISCUSSION

Metastatic melanoma is one of the most lethal and drug-resistant cutaneous tumors (30). As some anionic sialylated derivatives of GlcCer are highly and specifically expressed in melanomas and involved in the control of tumorigenesis (16), we speculated that GBA2, an enzyme capable of degrading GlcCer (19, 22), may modulate the malignant properties of melanoma. Here we describe an unappreciated and novel role for GBA2 in the control of melanoma cell growth likely through GlcCer degradation into ceramide leading to ER-stress and subsequent apoptosis of tumor cells.

We report that GBA2 expression was downregulated in human melanoma cells as compared to normal melanocytes. This might be related to the presence of tumor-associated mutations in the promoter region or coding sequence of the *GBA2* gene or to some epigenetic change. Although this hypothesis remains to be tested, note that the N370S mutation in the *GBA1* gene, which leads to the accumulation of GlcCer in the lysosomes of GD cells, is associated with an increased

risk to develop solid cancers including melanoma and hematological malignancies (31, 32). For instance, in a study of 1525 patients, the relative risk for non-Hodgkin lymphoma was 2.54, for melanoma 3.07, and for pancreas cancer 2.37 (31). The pathogenesis of cancers in GD has not yet been elucidated although it has been proposed that the lipid storage that occurs primarily in monocytic cells and macrophages leads to chronic stimulation of the immune system and subsequent lymphoproliferation (32). However, how the accumulation of GlcCer due to GBA1 deficiency (and the resulting lack of ceramide formation) promotes tumor development remains to be clarified.

GBA2 belongs to a group of at least 4 mammalian proteins that have been identified as GlcCer-degrading glucosidases, including GBA3 and the lactase-phlorizin hydrolase, which is possibly involved in the digestion of dietary GlcCer in the small intestine (33). Here we identified GBA2 as a novel source for ceramide generation through the catabolism of GlcCer, and demonstrated its ability to inhibit melanoma tumorigenesis. Of particular interest was the finding that mutations on Glu527 (Fig. 2) and Asp677 (data not shown) disrupting the catalytic activity of GBA2 abolished not only ceramide formation but also the antiproliferative effects of the nonlysosomal  $\beta$ -glucosidase on melanoma cells. Ceramide is a bioactive lipid, emerging as a proapoptotic (2, 3) but also anti-inflammatory (34) molecule, which confers antitumor properties to this metabolite. Ceramide-induced apoptosis has been linked to the activation of various protein kinases, phosphatases, or caspases, and to functional perturbations of multiple organelles, especially mitochondria and lysosomes (35). Notably, data presented here demonstrate that GBA2 acts as a molecular regulator of ceramide-mediated apoptosis by affecting ER homeostasis. Other ER-residing proteins involved in SL metabolism have recently been shown to regulate the UPR



**Figure 6.** Induction of apoptotic cell death in wt-GBA2-expressing melanoma cells. A375-derived clones were incubated for the indicated times in the absence or presence of 1  $\mu$ g/ml doxycycline. *A*) GBA2-3 cells were harvested, stained with PI, and DNA content was analyzed by flow cytometry. Percentages of hypodiploid cells are indicated. Data are the means  $\pm$  SE of 3 independent experiments. *B*) GBA2-3 and E527Q cells were incubated for 72 h with or without doxycycline and analyzed by flow cytometry. Percentages of annexin V-positive cells are indicated (means  $\pm$  SE of 5 different experiments). *C*) Activity of caspases-3/7. *D*) PARP processing (representative of 2 independent experiments). *E*, *F*) Caspase activation was examined in GBA2-3 and E527Q cells after treatment with 10 nM scrambled siRNA (Scr) or siRNA against ATF6, IRE1 $\alpha$ , and /or PERK alone or in combination. *E*) Knockdown efficiency as evaluated by RT-PCR and Western blot. *F*) Activity of caspases-3/7. Data are means  $\pm$  SE of 2 independent experiments performed in triplicate.


and modulate ER stress (36, 37). For instance, it was reported that pharmacological inhibition of serine palmitoyltransferase, the enzyme that catalyzes the first and rate-limiting step in the *de novo* formation of ceramide in the ER, prevented cannabinoid-triggered ER stress and subsequent autophagic cell death in human astrocytoma (38). Accordingly, ceramide accumulation in the ER, as a result of inactivation of *COL4A3BP*, the gene encoding the ceramide transfer protein CERT, has been described to promote ER stress and to sensitize numerous cancer cells to paclitaxel-induced apoptosis (39). Taken together, these observations reveal that ceramide can potently induce ER stress, resulting in cancer cell death. Our data also demonstrate that GBA2 elevated C<sub>16</sub>- and more strongly C<sub>24</sub>-ceramide levels. How these long- and very long-chain ceramide species, generated by GBA2, influence ER stress-triggered apoptosis deserves further investigation, as it appears that ceramides with different N-acyl chain lengths might have distinct

functions in the regulation of tumor progression and/or growth in a context-dependent manner (40). For instance, in human head and neck squamous cell carcinomas, ceramide synthase 6-generated C<sub>16</sub>-ceramide exerted a prosurvival role against ER stress-induced apoptosis, while ceramide synthase 1-generated C<sub>18</sub>-ceramide had the opposite effect (41).

Notably, findings presented here now suggest that intracellular GlcCer, *via* GBA2 activation, is a novel source for the induction of ceramide-mediated ER stress leading to melanoma cell death. Because GlcCer synthesis, catalyzed by the GCS, occurs on the cytosolic leaflet of cis-Golgi membranes, it is tempting to speculate that there is a retrograde traffic of GlcCer to the ER, where it could be degraded by GBA2 to produce ceramide. FAPP2, a cytoplasmic lipid transferase with a plekstrin homology domain, is the most likely candidate involved in this process, since FAPP2 silencing reduced transport of newly synthesized GlcCer to lumen of the ER (42). However, the role of

FAPP2 in ceramide-triggered apoptosis still remains obscure.

Overexpression of GBA2 clinically translated into a marked reduction of melanoma tumor burden. This system may have some limitations. The fact that no more than a 50% decrease was seen in tumor volume is not totally unexpected. Indeed, only one gene/protein (*i.e.*, GBA2) in the cancer cell was targeted; no other protein or component in the tumor microenvironment, or even the whole organism of the recipient, was targeted. Second, it is possible that the oral administration of the inducer did not allow a full expression of the target gene in the tumor in all animals at the same time. Third, ceramide is quite obviously not the unique modulator of melanoma growth and death (numerous players have already been described; see, for instance, ref. 43 for a review). Should a future strategy be based on the induction of GBA2, inducers of GBA2 gene expression (such as pharmacological compounds) may not be specific for melanoma cells, leading to side effects in other cell types. Thus, alternative strategies aimed at reducing tumor burden may combine different approaches: regarding ceramide metabolism in melanoma specifically, local administration of exogenous ceramides, as nanoliposomal formulations (44); manipulation of CerS expression, pharmacological inhibition of GCS (13), or/and ceramidases (24), may represent additional strategies.

The present findings thus identify for the first time GBA2 as a novel mechanism for the production of proapoptotic ceramide acting through ER stress. So far, the generation of a bioactive ceramide has been reported to occur either through stress-induced *de novo* biosynthesis or sphingomyelin breakdown (2). Only one study implicated the nonlysosomal degradation of GSLs *via* the plasma membrane sialidase Neu3 in human fibroblasts (45). A more in-depth analysis of the molecular mechanisms that regulate GBA2 expression and its antitumorigenic effects is required to better understand its role in melanoma progression. 

The authors thank N. Therville, S. Carpentier, and the staff of the animal facilities and the Plateforme d'Experimentation Fonctionnelle (S. Le Gonidec, A. Desquesnes, and A. Estival) for technical assistance. This project was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Paul Sabatier University, Pierre-Fabre Dermo-Cosmétique, Centre Européen de Recherche sur la Peau (Toulouse, France), and Generalitat de Catalunya (grant 2009SGR-1072). The authors declare no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Lahiri, S., and Futerman, A. H. (2007) The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 2270–2284
2. Ogretmen, B., and Hannun, Y. A. (2004) Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 604–616
3. Segui, B., Andrieu-Abadie, N., Jaffrezou, J. P., Benoist, H., and Levade, T. (2006) Sphingolipids as modulators of cancer cell death: potential therapeutic targets. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 2104–2120
4. Ryland, L. K., Fox, T. E., Liu, X., Loughran, T. P., and Kester, M. (2011) Dysregulation of sphingolipid metabolism in cancer. *Cancer Biol. Ther.* **11**, 138–149
5. Futerman, A. H., and Pagano, R. E. (1991) Determination of the intracellular sites and topology of glucosylceramide synthesis in rat liver. *Biochem. J.* **280**, 295–302
6. Uchida, Y., Itoh, M., Taguchi, Y., Yamaoka, S., Umehara, H., Ichikawa, S., Hirabayashi, Y., Holleran, W., and Okazaki, T. (2004) Ceramide reduction and transcriptional up-regulation of glucosylceramide synthase through doxorubicin-activated Sp1 in drug-resistant HL-60/ADR cells. *Cancer Res.* **64**, 6271–6279
7. Gouaze-Andersson, V., and Cabot, M. C. (2006) Glycosphingolipids and drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 2096–2103
8. Gouaze, V., Liu, Y. Y., Prickett, C. S., Yu, J. Y., Giuliano, A. E., and Cabot, M. C. (2005) Glucosylceramide synthase blockade down-regulates P-glycoprotein and resensitizes multidrug-resistant breast cancer cells to anticancer drugs. *Cancer Res.* **65**, 3861–3867
9. Liu, Y. Y., Patwardhan, G. A., Bhinge, K., Gupta, V., Gu, X., and Jazwinski, S. M. (2011) Suppression of glucosylceramide synthase restores p53-dependent apoptosis in mutant p53 cancer cells. *Cancer Res.* **71**, 2276–2285
10. Sietsma, H., Veldman, R. J., Kolk, D., Ausema, B., Nijhof, W., Kamps, W., Vellenga, E., and Kok, J. W. (2000) 1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol chemosensitizes neuroblastoma cells for taxol and vincristine. *Clin. Cancer Res.* **6**, 942–948
11. Hakomori, S. I. (2010) Glycosynaptic microdomains controlling tumor cell phenotype through alteration of cell growth, adhesion, and motility. *FEBS Lett.* **584**, 1901–1906
12. Guan, F., Handa, K., and Hakomori, S. I. (2009) Specific glycosphingolipids mediate epithelial-to-mesenchymal transition of human and mouse epithelial cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 7461–7466
13. Weiss, M., Hettmer, S., Smith, P., and Ladisch, S. (2003) Inhibition of melanoma tumor growth by a novel inhibitor of glucosylceramide synthase. *Cancer Res.* **63**, 3654–3658
14. Deng, W., Li, R., and Ladisch, S. (2000) Influence of cellular ganglioside depletion on tumor formation. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 912–917
15. Deng, W., Li, R., Guerrero, M., Liu, Y., and Ladisch, S. (2002) Transfection of glucosylceramide synthase antisense inhibits mouse melanoma formation. *Glycobiology* **12**, 145–152
16. Lo, A. S., Ma, Q., Liu, D. L., and Jungmans, R. P. (2010) Anti-GD3 chimeric sFv-CD28/T-cell receptor zeta designer T cells for treatment of metastatic melanoma and other neuroectodermal tumors. *Clin. Cancer Res.* **16**, 2769–2780
17. Futerman, A. H., and van Meer, G. (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 554–565
18. Beutler, E., and Grabowski, G. (2001) Gaucher disease. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C., Beaudet, A., Sly, W., and Valle, D., eds) Vol. **8**, pp. 3635–3668, McGraw-Hill, New York
19. Boot, R. G., Verhoek, M., Donker-Koopman, W., Strijland, A., van Marle, J., Overkleeft, H. S., Wennekes, T., and Aerts, J. M. (2007) Identification of the non-lysosomal glucosylceramidase as beta-glucosidase 2. *J. Biol. Chem.* **282**, 1305–1312
20. Hayashi, Y., Okino, N., Kakuta, Y., Shikanai, T., Tani, M., Narimatsu, H., and Ito, M. (2007) Klotho-related protein is a novel cytosolic neutral beta-glycosylceramidase. *J. Biol. Chem.* **282**, 30889–30900
21. Yahata, K., Mori, K., Arai, H., Koide, S., Ogawa, Y., Mukoyama, M., Sugawara, A., Ozaki, S., Tanaka, I., Nabeshima, Y., and Nakao, K. (2000) Molecular cloning and expression of a novel klotho-related protein. *J. Mol. Med.* **78**, 389–394
22. Yildiz, Y., Matern, H., Thompson, B., Allegood, J. C., Warren, R. L., Ramirez, D. M., Hammer, R. E., Hamra, F. K., Matern, S., and Russell, D. W. (2006) Mutation of beta-glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility. *J. Clin. Invest.* **116**, 2985–2994
23. Colie, S., Van Veldhoven, P. P., Kedjouar, B., Bedia, C., Albinet, V., Sorli, S. C., Garcia, V., Djavaheri-Mergny, M., Bauvy, C., Codogno, P., Levade, T., and Andrieu-Abadie, N. (2009) Disruption of sphingosine 1-phosphate lyase confers resistance to



- chemotherapy and promotes oncogenesis through Bcl-2/Bcl-xL upregulation. *Cancer Res.* **69**, 9346–9353
24. Bedia, C., Casas, J., Andrieu-Abadie, N., Fabrias, G., and Levade, T. (2011) Acid ceramidase expression modulates the sensitivity of A375 melanoma cells to dacarbazine. *J. Biol. Chem.* **286**, 28200–28209
  25. Salma, Y., Lafont, E., Therville, N., Carpentier, S., Bonnafé, M. J., Levade, T., Genisson, Y., and Andrieu-Abadie, N. (2009) The natural marine anhydrophyto sphingosine, Jaspine B, induces apoptosis in melanoma cells by interfering with ceramide metabolism. *Biochem. Pharmacol.* **78**, 477–485
  26. Portoukalian, J., Zwingelstein, G., and Dore, J. F. (1979) Lipid composition of human malignant melanoma tumors at various levels of malignant growth. *Eur. J. Biochem.* **94**, 19–23
  27. Cobucci-Ponzano, B., Aurilia, V., Riccio, G., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Strazzulli, A., Padula, A., Corsaro, M. M., Pieretti, G., Pocsfalvi, G., Fiume, I., Cannio, R., Rossi, M., and Moracci, M. (2010) A new archaeal beta-glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*: seeding a novel retaining beta-glycan-specific glycoside hydrolase family along with the human non-lysosomal glucosylceramidase GBA2. *J. Biol. Chem.* **285**, 20691–20703
  28. Boslem, E., MacIntosh, G., Preston, A. M., Bartley, C., Busch, A. K., Fuller, M., Laybutt, D. R., Meikle, P. J., and Biden, T. J. (2011) A lipidomic screen of palmitate-treated MIN6  $\beta$ -cells links sphingolipid metabolites with endoplasmic reticulum (ER) stress and impaired protein trafficking. *Biochem. J.* **435**, 267–276
  29. Ron, D., and Walter, P. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 519–529
  30. Kuphal, S., and Bosserhoff, A. (2009) Recent progress in understanding the pathology of malignant melanoma. *J. Pathol.* **219**, 400–409
  31. Landgren, O., Turesson, I., Gridley, G., and Caporaso, N. E. (2007) Risk of malignant disease among 1525 adult male US veterans with Gaucher disease. *Arch. Intern. Med.* **167**, 1189–1194
  32. Taddei, T. H., Kacena, K. A., Yang, M., Yang, R., Malhotra, A., Boxer, M., Aleck, K. A., Rennert, G., Pastores, G. M., and Mistry, P. K. (2009) The underrecognized progressive nature of N370S Gaucher disease and assessment of cancer risk in 403 patients. *Am. J. Hematol.* **84**, 208–214
  33. Kobayashi, T., and Suzuki, K. (1981) The glucosylceramidase in the murine intestine. Purification and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **256**, 7768–7773
  34. Kitatani, K., Sheldon, K., Anelli, V., Jenkins, R. W., Sun, Y., Grabowski, G. A., Obeid, L. M., and Hannun, Y. A. (2009) Acid beta-glycosidase I counteracts p38delta-dependent induction of interleukin-6: possible role for ceramide as an anti-inflammatory lipid. *J. Biol. Chem.* **284**, 12979–12988
  35. Morales, A., Lee, H., Goni, F. M., Kolesnick, R., and Fernandez-Checa, J. C. (2007) Sphingolipids and cell death. *Apoptosis* **12**, 923–939
  36. Sauane, M., Su, Z. Z., Dash, R., Liu, X., Norris, J. S., Sarkar, D., Lee, S. G., Allegood, J. C., Dent, P., Spiegel, S., and Fisher, P. B. (2010) Ceramide plays a prominent role in MDA-7/IL-24-induced cancer-specific apoptosis. *J. Cell. Physiol.* **222**, 546–555
  37. Lepine, S., Allegood, J. C., Park, M., Dent, P., Milstien, S., and Spiegel, S. (2011) Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase-1 regulates ER stress-induced autophagy. *Cell Death Differ.* **18**, 350–361
  38. Salazar, M., Carracedo, A., Salanueva, I. J., Hernandez-Tiedra, S., Lorente, M., Egia, A., Vazquez, P., Blazquez, C., Torres, S., Garcia, S., Nowak, J., Fimia, G. M., Piacentini, M., Cecconi, F., Pandolfi, P. P., Gonzalez-Feria, L., Iovanna, J. L., Guzman, M., Boya, P., and Velasco, G. (2009) Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J. Clin. Invest.* **119**, 1359–1372
  39. Swanton, C., Marani, M., Pardo, O., Warne, P. H., Kelly, G., Sahai, E., Elustondo, F., Chang, J., Temple, J., Ahmed, A. A., Brenton, J. D., Downward, J., and Nicke, B. (2007) Regulators of mitotic arrest and ceramide metabolism are determinants of sensitivity to paclitaxel and other chemotherapeutic drugs. *Cancer Cell* **11**, 498–512
  40. Ponnusamy, S., Meyers-Needham, M., Senkal, C., Saddoughi, S. A., Sentelle, D., Selvam, S. P., Salas, A., and Ogretmen, B. (2010) Sphingolipids and cancer: ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance. *Future Oncol.* **10**, 1603–1624
  41. Senkal, C. E., Ponnusamy, S., Manevich, Y., Meyers-Needham, M., Saddoughi, S. A., Mukhopadhyay, A., Dent, P., Bielawski, J., and Ogretmen, B. (2011) Alteration of ceramide Synthase 6/C16-ceramide induces activating transcription factor 6-mediated ER-stress and apoptosis via perturbation of cellular Ca<sup>2+</sup> and ER/Golgi membrane network. *J. Biol. Chem.* **286**, 42446–42458
  42. Halter, D., Neumann, S., van Dijk, S. M., Wolthoorn, J., de Maziere, A. M., Vieira, O. V., Mattjus, P., Klumperman, J., van Meer, G., and Sprong, H. (2007) Pre- and post-Golgi translocation of glucosylceramide in glycosphingolipid synthesis. *J. Cell Biol.* **179**, 101–115
  43. Soengas, M. S., and Lowe, S. W. (2003) Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* **22**, 3138–3151
  44. Tran, M. A., Smith, C. D., Kester, M., and Robertson, G. P. (2008) Combining nanoliposomal ceramide with sorafenib synergistically inhibits melanoma and breast cancer cell survival to decrease tumor development. *Clin. Cancer Res.* **14**, 3571–3581
  45. Valaperta, R., Chigorno, V., Basso, L., Prinetti, A., Bresciani, R., Preti, A., Miyagi, T., and Sonnino, S. (2006) Plasma membrane production of ceramide from ganglioside GM3 in human fibroblasts. *FASEB J.* **20**, 1227–1229

Received for publication June 22, 2012.  
Accepted for publication October 1, 2012.



# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Ackermann J, Fruttschi M, Kaloulis K, McKee T, Trumpp A, and Beermann F. (2005). Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res.* **65**: 4005–4011.
- Ader I, Brizuela L, Bouquerel P, Malavaud B, and Cuvillier O. (2008). Sphingosine kinase 1: a new modulator of hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  during hypoxia in human cancer cells. *Cancer Res.* **68**: 8635–8642.
- Ader I, Malavaud B, and Cuvillier O. (2009). When the sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate pathway meets hypoxia signaling: new targets for cancer therapy. *Cancer Res.* **69**: 3723–3726.
- Aguilar A, and Saba JD. (2011). Truth and consequences of sphingosine-1-phosphate lyase. *Adv. Enzyme Regul. [Internet]*. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21946005>
- Ahmad M, Long JS, Pyne NJ, and Pyne S. (2006). The effect of hypoxia on lipid phosphate receptor and sphingosine kinase expression and mitogen-activated protein kinase signaling in human pulmonary smooth muscle cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **79**: 278–286.
- Akagi Y, Liu W, Zebrowski B, Xie K, and Ellis LM. (1998). Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by insulin-like growth factor-I. *Cancer Res.* **58**: 4008–4014.
- Alderton F, Rakhit S, Kong KC, Palmer T, Sambhi B, Pyne S, *et al.* (2001). Tethering of the platelet-derived growth factor beta receptor to G-protein-coupled receptors. A novel platform for integrative signaling by these receptor classes in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 28578–28585.
- Alemanly R, Kleuser B, Ruwisch L, Danneberg K, Lass H, Hashemi R, *et al.* (2001). Depolarisation induces rapid and transient formation of intracellular sphingosine-1-phosphate. *FEBS Lett.* **509**: 239–244.
- Alemanly R, van Koppen CJ, Danneberg K, Ter Braak M, and Meyer Zu Heringdorf D. (2007). Regulation and functional roles of sphingosine kinases. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **374**: 413–428.
- Alemanly R, Sichelschmidt B, zu Heringdorf DM, Lass H, van Koppen CJ, and Jakobs KH. (2000). Stimulation of sphingosine-1-phosphate formation by the P2Y(2) receptor in HL-60 cells: Ca(2+) requirement and implication in receptor-mediated Ca(2+) mobilization, but not MAP kinase activation. *Mol. Pharmacol.* **58**: 491–497.
- Alexander S, and Alexander H. (2011). Lead genetic studies in Dictyostelium discoideum and translational studies in human cells demonstrate that sphingolipids are key regulators of sensitivity to cisplatin and other anticancer drugs. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**: 97–104.
- Allende ML, Sasaki T, Kawai H, Olivera A, Mi Y, van Echten-Deckert G, *et al.* (2004). Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720. *J. Biol. Chem.* **279**: 52487–52492.
- Alvarez SE, Harikumar KB, Hait NC, Allegood J, Strub GM, Kim EY, *et al.* (2010). Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature* **465**: 1084–1088.
- Alvarez SE, Milstien S, and Spiegel S. (2007). Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *Trends Endocrinol. Metab.* **18**: 300–307.

- Ancellin N, Colmont C, Su J, Li Q, Mittereder N, Chae S-S, *et al.* (2002). Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation. *J. Biol. Chem* **277**: 6667–6675.
- Anderberg C, Li H, Fredriksson L, Andrae J, Betsholtz C, Li X, *et al.* (2009). Paracrine signaling by platelet-derived growth factor-CC promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Cancer Res.* **69**: 369–378.
- Anelli V, Gault CR, Cheng AB, and Obeid LM. (2008). Sphingosine kinase 1 is up-regulated during hypoxia in U87MG glioma cells. Role of hypoxia-inducible factors 1 and 2. *J. Biol. Chem.* **283**: 3365–3375.
- Anelli V, Gault CR, Snider AJ, and Obeid LM. (2010). Role of sphingosine kinase-1 in paracrine/transcellular angiogenesis and lymphangiogenesis in vitro. *FASEB J.* **24**: 2727–2738.
- Aprelikova O, Palla J, Hibler B, Yu X, Greer YE, Yi M, *et al.* (2012). Silencing of miR-148a in cancer-associated fibroblasts results in WNT10B-mediated stimulation of tumor cell motility. *Oncogene [Internet]*. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22890324>
- Arikawa K, Takuwa N, Yamaguchi H, Sugimoto N, Kitayama J, Nagawa H, *et al.* (2003). Ligand-dependent inhibition of B16 melanoma cell migration and invasion via endogenous S1P2 G protein-coupled receptor. Requirement of inhibition of cellular RAC activity. *J. Biol. Chem.* **278**: 32841–32851.
- Arkenau H-T, Kefford R, and Long GV. (2011). Targeting BRAF for patients with melanoma. *Br. J. Cancer* **104**: 392–398.
- Artal-Sanz M, and Tavernarakis N. (2009). Prohibitin and mitochondrial biology. *Trends Endocrinol. Metab.* **20**: 394–401.
- Asnacios A, Courbon F, Rochaix P, Bauvin E, Cances-Lauwers V, Susini C, *et al.* (2008). Indium-111-pentetreotide scintigraphy and somatostatin receptor subtype 2 expression: new prognostic factors for malignant well-differentiated endocrine tumors. *J. Clin. Oncol.* **26**: 963–970.
- Autier P, Doré J-F, Eggermont AMM, and Coebergh JW. (2011). Epidemiological evidence that UVA radiation is involved in the genesis of cutaneous melanoma. *Curr Opin Oncol* **23**: 189–196.
- Aziz SA, Davies M, Pick E, Zito C, Jilaveanu L, Camp RL, *et al.* (2009). Phosphatidylinositol-3-kinase as a therapeutic target in melanoma. *Clin. Cancer Res.* **15**: 3029–3036.
- Azuma H, Horie S, Muto S, Otsuki Y, Matsumoto K, Morimoto J, *et al.* (2003). Selective cancer cell apoptosis induced by FTY720; evidence for a Bcl-dependent pathway and impairment in ERK activity. *Anticancer Res.* **23**: 3183–3193.
- Bagdanoff JT, Donoviel MS, Nouraldean A, Carlsen M, Jessop TC, Tarver J, *et al.* (2010). Inhibition of sphingosine 1-phosphate lyase for the treatment of rheumatoid arthritis: discovery of (E)-1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)-1H-imidazol-2-yl)ethanone oxime (LX2931) and (1R,2S,3R)-1-(2-(isoxazol-3-yl)-1H-imidazol-4-yl)butane-1,2,3,4-tetraol (LX2932). *J. Med. Chem.* **53**: 8650–8662.
- Balthasar S, Bergelin N, Löf C, Vainio M, Andersson S, and Törnquist K. (2008). Interactions between sphingosine-1-phosphate and vascular endothelial growth factor signalling in ML-1 follicular thyroid carcinoma cells. *Endocr. Relat. Cancer* **15**: 521–534.

- Bandhuvula P, Honbo N, Wang G-Y, Jin Z-Q, Fyrst H, Zhang M, *et al.* (2011). S1P lyase: a novel therapeutic target for ischemia-reperfusion injury of the heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **300**: H1753–1761.
- Bandhuvula P, and Saba JD. (2007). Sphingosine-1-phosphate lyase in immunity and cancer: silencing the siren. *Trends Mol Med* **13**: 210–217.
- Bardeesy N, Bastian BC, Hezel A, Pinkel D, DePinho RA, and Chin L. (2001). Dual inactivation of RB and p53 pathways in RAS-induced melanomas. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 2144–2153.
- Barr RK, Lynn HE, Moretti PAB, Khew-Goodall Y, and Pitson SM. (2008). Deactivation of sphingosine kinase 1 by protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* **283**: 34994–35002.
- Bartke N, and Hannun YA. (2009). Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J. Lipid Res.* **50** **Suppl**: S91–96.
- Basset P, Okada A, Chenard MP, Kannan R, Stoll I, Anglard P, *et al.* (1997). Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. *Matrix Biol.* **15**: 535–541.
- Bayerl MG. (2008). Sphingosine kinase 1 protein and mRNA are overexpressed in non-Hodgkin lymphomas and are attractive targets for novel pharmacological interventions. *Leuk. Lymphoma* **49**: 948–954.
- Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE, *et al.* (1994). Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* **79**: 1277–1285.
- Becker JC, Houben R, Schrama D, Voigt H, Ugurel S, and Reisfeld RA. (2010). Mouse models for melanoma: a personal perspective. *Exp. Dermatol.* **19**: 157–164.
- Bektas M, Allende ML, Lee BG, Chen W, Amar MJ, Remaley AT, *et al.* (2010). Sphingosine 1-phosphate lyase deficiency disrupts lipid homeostasis in liver. *J. Biol. Chem.* **285**: 10880–10889.
- Bektas M, Jolly PS, Müller C, Eberle J, Spiegel S, and Geilen CC. (2005). Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression. *Oncogene* **24**: 178–187.
- Beljanski V, Knaak C, and Smith CD. (2010). A novel sphingosine kinase inhibitor induces autophagy in tumor cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **333**: 454–464.
- Beljanski V, Knaak C, Zhuang Y, and Smith CD. (2011).(a). Combined anticancer effects of sphingosine kinase inhibitors and sorafenib. *Invest New Drugs* **29**: 1132–1142.
- Beljanski V, Lewis CS, and Smith CD. (2011).(b). Antitumor activity of sphingosine kinase 2 inhibitor ABC294640 and sorafenib in hepatocellular carcinoma xenografts. *Cancer Biol. Ther.* **11**: 524–534.
- Bennett DC, and Medrano EE. (2002). Molecular regulation of melanocyte senescence. *Pigment Cell Res.* **15**: 242–250.

- Berkelhammer J, Oxenhandler RW, Hook RR Jr, and Hennessy JM. (1982). Development of a new melanoma model in C57BL/6 mice. *Cancer Res.* **42**: 3157–3163.
- Berking C, Takemoto R, Schaidler H, Showe L, Satyamoorthy K, Robbins P, *et al.* (2001). Transforming growth factor-beta1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling. *Cancer Res.* **61**: 8306–8316.
- Bermont L, Lamielle F, Fauconnet S, Esumi H, Weisz A, and Adessi GL. (2000). Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor-I in endometrial adenocarcinoma cells. *Int. J. Cancer* **85**: 117–123.
- Bernardini M. (2005). High-resolution mapping of genomic imbalance and identification of gene expression profiles associated with differential chemotherapy response in serous epithelial ovarian cancer. *Neoplasia* **7**: 603–613.
- Bertolotto C, Lesueur F, Giuliano S, Strub T, de Lichy M, Bille K, *et al.* (2011). A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature* **480**: 94–98.
- Betito S, and Cuvillier O. (2006). Regulation by sphingosine 1-phosphate of Bax and Bad activities during apoptosis in a MEK-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**: 1273–1277.
- Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, Gorska AE, Dumont N, Shappell S, *et al.* (2004).(a). TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* **303**: 848–851.
- Bhowmick NA, Neilson EG, and Moses HL. (2004).(b). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* **432**: 332–337.
- Bierie B, and Moses HL. (2006). Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**: 506–520.
- Billich A, Bornancin F, Dévay P, Mechtcheriakova D, Urtz N, and Baumruker T. (2003). Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases. *J. Biol. Chem.* **278**: 47408–47415.
- Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, and Vande Woude GF. (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**: 915–925.
- Bonnaud S, Niaudet C, Legoux F, Corre I, Delpon G, Saulquin X, *et al.* (2010). Sphingosine-1-phosphate activates the AKT pathway to protect small intestines from radiation-induced endothelial apoptosis. *Cancer Res.* **70**: 9905–9915.
- Bonnaud S, Niaudet C, Pottier G, Gaugler M-H, Millour J, Barbet J, *et al.* (2007). Sphingosine-1-phosphate protects proliferating endothelial cells from ceramide-induced apoptosis but not from DNA damage-induced mitotic death. *Cancer Res.* **67**: 1803–1811.
- Bornfeldt KE, Graves LM, Raines EW, Igarashi Y, Wayman G, Yamamura S, *et al.* (1995). Sphingosine-1-phosphate inhibits PDGF-induced chemotaxis of human arterial smooth muscle cells: spatial and temporal modulation of PDGF chemotactic signal transduction. *J. Cell Biol.* **130**: 193–206.

- Borowsky AD, Bandhuvula P, Kumar A, Yoshinaga Y, Nefedov M, Fong LG, *et al.* (2012). Sphingosine-1-phosphate lyase expression in embryonic and adult murine tissues. *J. Lipid Res.* **53**: 1920–1931.
- Boujaoude LC, Bradshaw-Wilder C, Mao C, Cohn J, Ogretmen B, Hannun YA, *et al.* (2001). Cystic fibrosis transmembrane regulator regulates uptake of sphingoid base phosphates and lysophosphatidic acid: modulation of cellular activity of sphingosine 1-phosphate. *J. Biol. Chem.* **276**: 35258–35264.
- Bradl M, Klein-Szanto A, Porter S, and Mintz B. (1991). Malignant melanoma in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 164–168.
- Brennen WN, Isaacs JT, and Denmeade SR. (2012). Rationale behind targeting fibroblast activation protein-expressing carcinoma-associated fibroblasts as a novel chemotherapeutic strategy. *Mol. Cancer Ther.* **11**: 257–266.
- Brindley DN, English D, Pilquil C, Buri K, and Ling ZC. (2002). Lipid phosphate phosphatases regulate signal transduction through glycerolipids and sphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1582**: 33–44.
- Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, Heining P, Schmouder R, Francis G, *et al.* (2010). Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov* **9**: 883–897.
- Van Brocklyn JR, Jackson CA, Pearl DK, Kotur MS, Snyder PJ, and Prior TW. (2005). Sphingosine kinase-1 expression correlates with poor survival of patients with glioblastoma multiforme: roles of sphingosine kinase isoforms in growth of glioblastoma cell lines. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **64**: 695–705.
- Van Brocklyn JR, Young N, and Roof R. (2003). Sphingosine-1-phosphate stimulates motility and invasiveness of human glioblastoma multiforme cells. *Cancer Lett.* **199**: 53–60.
- Brocklyn JRV. (2010). Regulation of cancer cell migration and invasion by sphingosine-1-phosphate. *World J Biol Chem* **1**: 307–312.
- Brooks PC, Strömblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, *et al.* (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* **85**: 683–693.
- Broome Powell M, Gause PR, Hyman P, Gregus J, Lluria-Prevatt M, Nagle R, *et al.* (1999). Induction of melanoma in TPas transgenic mice. *Carcinogenesis* **20**: 1747–1753.
- Bryan L, Paugh BS, Kapitonov D, Wilczynska KM, Alvarez SM, Singh SK, *et al.* (2008). Sphingosine-1-phosphate and interleukin-1 independently regulate plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase-type plasminogen activator receptor expression in glioblastoma cells: implications for invasiveness. *Mol. Cancer Res.* **6**: 1469–1477.
- Brychtova S, Bezdekova M, Hirnak J, Sedlakova E, Tichy M, and Brycht T. (2011). Stromal Microenvironment Alterations in Malignant Melanoma. In: Murph M, editor. *Research on Melanoma - A Glimpse into Current Directions and Future Trends*. InTech. Available from: <http://www.intechopen.com/books/howtoreference/research-on-melanoma-a-glimpse-into-current-directions-and-future-trends/stromal-microenvironment-alterations-in-malignant-melanoma>



- Buehrer BM, Bardes ES, and Bell RM. (1996). Protein kinase C-dependent regulation of human erythroleukemia (HEL) cell sphingosine kinase activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1303**: 233–242.
- Bush JA, and Li G. (2003). The role of Bcl-2 family members in the progression of cutaneous melanoma. *Clin. Exp. Metastasis* **20**: 531–539.
- Camps JL, Chang SM, Hsu TC, Freeman MR, Hong SJ, Zhou HE, *et al.* (1990). Fibroblast-mediated acceleration of human epithelial tumor growth in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 75–79.
- Carmeliet P, and Jain RK. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**: 298–307.
- Cattoretti G, Mandelbaum J, Lee N, Chaves AH, Mahler AM, Chadburn A, *et al.* (2009). Targeted disruption of the S1P2 sphingosine 1-phosphate receptor gene leads to diffuse large B-cell lymphoma formation. *Cancer Res.* **69**: 8686–8692.
- Chae S-S, Paik J-H, Furneaux H, and Hla T. (2004). Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference. *J. Clin. Invest.* **114**: 1082–1089.
- Chan H, and Pitson SM. (2012). Post-translational regulation of sphingosine kinases. *Biochim. Biophys. Acta.*
- Chang C-L, Ho M-C, Lee P-H, Hsu C-Y, Huang W-P, and Lee H. (2009). S1P(5) is required for sphingosine 1-phosphate-induced autophagy in human prostate cancer PC-3 cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **297**: C451–458.
- Chantrain C, and DeClerck YA. (2002). The matrix metalloproteinases and their synthetic inhibitors in tumor progression. *M S-Med. Sci.* **18**: 565–575.
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, *et al.* (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N. Engl. J. Med.* **364**: 2507–2516.
- Chatelain C, Ciarletta P, and Ben Amar M. (2011). Morphological changes in early melanoma development: influence of nutrients, growth inhibitors and cell-adhesion mechanisms. *J. Theor. Biol.* **290**: 46–59.
- Chawla R, Procknow JA, Tantravahi RV, Khurana JS, Litvin J, and Reddy EP. (2010). Cooperativity of Cdk4R24C and Ras in melanoma development. *Cell Cycle* **9**: 3305–3314.
- Chen S, Zhu H, Wetzel WJ, and Philbert MA. (1996). Spontaneous melanocytosis in transgenic mice. *J. Invest. Dermatol.* **106**: 1145–1151.
- Chen WV, Delrow J, Corrin PD, Frazier JP, and Soriano P. (2004). Identification and validation of PDGF transcriptional targets by microarray-coupled gene-trap mutagenesis. *Nat. Genet.* **36**: 304–312.
- Chi H, and Flavell RA. (2005). Cutting edge: regulation of T cell trafficking and primary immune responses by sphingosine 1-phosphate receptor 1. *J. Immunol.* **174**: 2485–2488.
- Chi H. (2011). Sphingosine-1-phosphate and immune regulation: trafficking and beyond. *Trends Pharmacol. Sci.* **32**: 16–24.

- Chiba Y, Takeuchi H, Sakai H, and Misawa M. (2010). SKI-II, an inhibitor of sphingosine kinase, ameliorates antigen-induced bronchial smooth muscle hyperresponsiveness, but not airway inflammation, in mice. *J. Pharmacol. Sci.* **114**: 304–310.
- Chin L, Garraway LA, and Fisher DE. (2006). Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev.* **20**: 2149–2182.
- Chin L, Pomerantz J, Polsky D, Jacobson M, Cohen C, Cordon-Cardo C, *et al.* (1997). Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. *Genes Dev.* **11**: 2822–2834.
- Chin L, Tam A, Pomerantz J, Wong M, Holash J, Bardeesy N, *et al.* (1999). Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* **400**: 468–472.
- Chipuk JE, McStay GP, Bharti A, Kuwana T, Clarke CJ, Siskind LJ, *et al.* (2012). Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. *Cell* **148**: 988–1000.
- Choi JW, Gardell SE, Herr DR, Rivera R, Lee C-W, Noguchi K, *et al.* (2011).(a). FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**: 751–756.
- Choi KY, Chang K, Pickel JM, Badger JD 2nd, and Roche KW. (2011).(b). Expression of the metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) induces melanoma in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**: 15219–15224.
- Christensen JG, Burrows J, and Salgia R. (2005). c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. *Cancer Lett.* **225**: 1–26.
- Christoffersen C, Obinata H, Kumaraswamy SB, Galvani S, Ahnström J, Sevana M, *et al.* (2011). Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**: 9613–9618.
- Chudnovsky Y, Khavari PA, and Adams AE. (2005). Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J. Clin. Invest.* **115**: 813–824.
- Chun J, Hla T, Lynch KR, Spiegel S, and Moolenaar WH. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* **62**: 579–587.
- Chung S. (2012). Basal Cell Carcinoma. *Archives of Plastic Surgery* **39**: 166.
- Cirri P, and Chiarugi P. (2012). Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* **31**: 195–208.
- Colié S, Van Veldhoven PP, Kedjouar B, Bedia C, Albinet V, Sorli S-C, *et al.* (2009). Disruption of sphingosine 1-phosphate lyase confers resistance to chemotherapy and promotes oncogenesis through Bcl-2/Bcl-xL upregulation. *Cancer Res* **69**: 9346–9353.
- Contassot E, Jankovic D, Schuler P, Preynat-Seauve O, Gehrke S, Kerl K, *et al.* (2012). Carcinogen treatment in mouse selectively expressing activated N-Ras Q61K in melanocytes recapitulates metastatic cutaneous melanoma development. *Pigment Cell Melanoma Res* **25**: 275–278.

- Cooper M, and Pinkus H. (1977). Intrauterine transplantation of rat basal cell carcinoma as a model for reconversion of malignant to benign growth. *Cancer Res.* **37**: 2544–2552.
- Cunningham CC. (2007). Talabostat. *Expert Opin Investig Drugs* **16**: 1459–1465.
- Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, *et al.* (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N. Engl. J. Med.* **353**: 2135–2147.
- Cuvillier O, and Levade T. (2001). Sphingosine 1-phosphate antagonizes apoptosis of human leukemia cells by inhibiting release of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria. *Blood* **98**: 2828–2836.
- Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, *et al.* (1996). Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* **381**: 800–803.
- Daido S, Kanzawa T, Yamamoto A, Takeuchi H, Kondo Y, and Kondo S. (2004). Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res.* **64**: 4286–4293.
- Damsky WE Jr, and Bosenberg M. (2010). Mouse melanoma models and cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res* **23**: 853–859.
- Danen EH, Ten Berge PJ, Van Muijen GN, Van 't Hof-Grootenboer AE, Bröcker EB, and Ruiters DJ. (1994). Emergence of alpha 5 beta 1 fibronectin- and alpha v beta 3 vitronectin-receptor expression in melanocytic tumour progression. *Histopathology* **24**: 249–256.
- Dankort D, Curley DP, Cartlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky WE Jr, *et al.* (2009). Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat. Genet.* **41**: 544–552.
- Dannenberg J-H, David G, Zhong S, van der Torre J, Wong WH, and Depinho RA. (2005). mSin3A corepressor regulates diverse transcriptional networks governing normal and neoplastic growth and survival. *Genes Dev.* **19**: 1581–1595.
- DeCosse JJ, Gossens C, Kuzma JF, and Unsworth BR. (1975). Embryonic inductive tissues that cause histologic differentiation of murine mammary carcinoma in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.* **54**: 913–922.
- DeCosse JJ, Gossens CL, Kuzma JF, and Unsworth BR. (1973). Breast cancer: induction of differentiation by embryonic tissue. *Science* **181**: 1057–1058.
- Delmas V, Beermann F, Martinozzi S, Carreira S, Ackermann J, Kumasaka M, *et al.* (2007). Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes Dev.* **21**: 2923–2935.
- Delon C, Manifava M, Wood E, Thompson D, Krugmann S, Pyne S, *et al.* (2004). Sphingosine kinase 1 is an intracellular effector of phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **279**: 44763–44774.
- Deng J, Liu Y, Lee H, Herrmann A, Zhang W, Zhang C, *et al.* (2012). S1PR1-STAT3 signaling is crucial for myeloid cell colonization at future metastatic sites. *Cancer Cell* **21**: 642–654.
- Desgrosellier JS, and Chersesh DA. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **10**: 9–22.

- Devine KM, Smicun Y, Hope JM, and Fishman DA. (2008). S1P induced changes in epithelial ovarian cancer proteolysis, invasion, and attachment are mediated by Gi and Rac. *Gynecol. Oncol.* **110**: 237–245.
- Dhomen N, Reis-Filho JS, da Rocha Dias S, Hayward R, Savage K, Delmas V, *et al.* (2009). Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* **15**: 294–303.
- Ding G, Sonoda H, Yu H, Kajimoto T, Goparaju SK, Jahangeer S, *et al.* (2007). Protein kinase D-mediated phosphorylation and nuclear export of sphingosine kinase 2. *J. Biol. Chem.* **282**: 27493–27502.
- Direkze NC, Hodivala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulson R, Oukrif D, *et al.* (2004). Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Res.* **64**: 8492–8495.
- Döll F, Pfeilschifter J, and Huwiler A. (2007). Prolactin upregulates sphingosine kinase-1 expression and activity in the human breast cancer cell line MCF7 and triggers enhanced proliferation and migration. *Endocr. Relat. Cancer* **14**: 325–335.
- Don AS, and Rosen H. (2009). A lipid binding domain in sphingosine kinase 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **380**: 87–92.
- Dong J, Grunstein J, Tejada M, Peale F, Frantz G, Liang W-C, *et al.* (2004). VEGF-null cells require PDGFR alpha signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis. *EMBO J.* **23**: 2800–2810.
- Dorsky RI, Moon RT, and Raible DW. (1998). Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. *Nature* **396**: 370–373.
- Dovey M, White RM, and Zon LI. (2009). Oncogenic NRAS cooperates with p53 loss to generate melanoma in zebrafish. *Zebrafish* **6**: 397–404.
- Drabsch Y, and Ten Dijke P. (2012). TGF- $\beta$  signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer metastasis reviews* [Internet]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22714591>
- Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R, Kammula U, *et al.* (2008). Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J. Clin. Oncol.* **26**: 5233–5239.
- Dvorak HF. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.* **315**: 1650–1659.
- Eggermont AMM, and Robert C. (2011). New drugs in melanoma: it's a whole new world. *Eur. J. Cancer* **47**: 2150–2157.
- Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, *et al.* (2001). Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev.* **15**: 50–65.
- Elias PM, and Menon GK. (1991). Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv. Lipid Res.* **24**: 1–26.

- Epstein JH, Epstein WL, and Nakai T. (1967). Production of melanomas from DMBA-induced 'blue nevi' in hairless mice with ultraviolet light. *J. Natl. Cancer Inst.* **38**: 19–30.
- von Felbert V, Córdoba F, Weissenberger J, Vallan C, Kato M, Nakashima I, *et al.* (2005). Interleukin-6 gene ablation in a transgenic mouse model of malignant skin melanoma. *Am. J. Pathol.* **166**: 831–841.
- Felding-Habermann B, Fransvea E, O'Toole TE, Manzuk L, Faha B, and Hensler M. (2002). Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* **19**: 427–436.
- Ferguson B, Konrad Muller H, Handoko HY, Khosrotehrani K, Beermann F, Hacker E, *et al.* (2010). Differential roles of the pRb and Arf/p53 pathways in murine naevus and melanoma genesis. *Pigment Cell & Melanoma Research* **23**: 771–780.
- Flach EH, Rebecca VW, Herlyn M, Smalley KSM, and Anderson ARA. (2011). Fibroblasts contribute to melanoma tumor growth and drug resistance. *Mol. Pharm.* **8**: 2039–2049.
- Flaherty KT. (2012). Targeting Metastatic Melanoma. *Annual Review of Medicine* **63**: 171–183.
- Forrest M, Sun S-Y, Hajdu R, Bergstrom J, Card D, Doherty G, *et al.* (2004). Immune cell regulation and cardiovascular effects of sphingosine 1-phosphate receptor agonists in rodents are mediated via distinct receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **309**: 758–768.
- Forsberg K, Valyi-Nagy I, Heldin CH, Herlyn M, and Westermark B. (1993). Platelet-derived growth factor (PDGF) in oncogenesis: development of a vascular connective tissue stroma in xenotransplanted human melanoma producing PDGF-BB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 393–397.
- French KJ, Schrecengost RS, Lee BD, Zhuang Y, Smith SN, Eberly JL, *et al.* (2003). Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Res.* **63**: 5962–5969.
- French KJ, Upson JJ, Keller SN, Zhuang Y, Yun JK, and Smith CD. (2006). Antitumor activity of sphingosine kinase inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **318**: 596–603.
- French KJ, Zhuang Y, Maines LW, Gao P, Wang W, Beljanski V, *et al.* (2010). Pharmacology and antitumor activity of ABC294640, a selective inhibitor of sphingosine kinase-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **333**: 129–139.
- Fujita T, Okada T, Hayashi S, Jahangeer S, Miwa N, and Nakamura S. (2004). Delta-catenin/NPRAP (neural plakophilin-related armadillo repeat protein) interacts with and activates sphingosine kinase 1. *Biochem. J.* **382**: 717–723.
- Fujiwara Y, Osborne DA, Walker MD, Wang D, Bautista DA, Liliom K, *et al.* (2007). Identification of the hydrophobic ligand binding pocket of the S1P1 receptor. *J. Biol. Chem.* **282**: 2374–2385.
- Fukuda Y, Aoyama Y, Wada A, and Igarashi Y. (2004). Identification of PECAM-1 association with sphingosine kinase 1 and its regulation by agonist-induced phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1636**: 12–21.
- Fukuda Y, Kihara A, and Igarashi Y. (2003). Distribution of sphingosine kinase activity in mouse tissues: contribution of SPHK1. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **309**: 155–160.

- Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, *et al.* (1998). Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* **94**: 715–725.
- Furuhashi M, Sjöblom T, Abramsson A, Ellingsen J, Micke P, Li H, *et al.* (2004). Platelet-derived growth factor production by B16 melanoma cells leads to increased pericyte abundance in tumors and an associated increase in tumor growth rate. *Cancer Res.* **64**: 2725–2733.
- Futerman AH, and Hannun YA. (2004). The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* **5**: 777–782.
- Fuyuhiko Y, Yashiro M, Noda S, Matsuoka J, Hasegawa T, Kato Y, *et al.* (2012). Cancer-associated orthotopic myofibroblasts stimulates the motility of gastric carcinoma cells. *Cancer Sci.* **103**: 797–805.
- Fyrst H, and Saba JD. (2010). An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators. *Nat Chem Biol* **6**: 489–497.
- Fyrst H, and Saba JD. (2008). Sphingosine-1-phosphate lyase in development and disease: sphingolipid metabolism takes flight. *Biochim. Biophys. Acta* **1781**: 448–458.
- Gallagher PG, Bao Y, Prorock A, Zigrino P, Nischt R, Politi V, *et al.* (2005). Gene expression profiling reveals cross-talk between melanoma and fibroblasts: implications for host-tumor interactions in metastasis. *Cancer Res.* **65**: 4134–4146.
- Gamble JR, and Vadas MA. (1988). Endothelial adhesiveness for blood neutrophils is inhibited by transforming growth factor-beta. *Science* **242**: 97–99.
- Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, *et al.* (2005).(a). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur. J. Cancer* **41**: 28–44.
- Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, *et al.* (2005).(b). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur. J. Cancer* **41**: 2040–2059.
- Gao P, and Smith CD. (2011). Ablation of sphingosine kinase-2 inhibits tumor cell proliferation and migration. *Mol. Cancer Res.* **9**: 1509–1519.
- Gault CR, Eblen ST, Neumann CA, Hannun YA, and Obeid LM. (2012). Oncogenic K-Ras Regulates Bioactive Sphingolipids in a Sphingosine Kinase 1 Dependent Manner. *The Journal of biological chemistry* [Internet]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22833671>
- Gault CR, Obeid LM, and Hannun YA. (2010). An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv. Exp. Med. Biol.* **688**: 1–23.
- Gellings Lowe N, Swaney JS, Moreno KM, and Sabbadini RA. (2009). Sphingosine-1-phosphate and sphingosine kinase are critical for transforming growth factor-beta-stimulated collagen production by cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* **82**: 303–312.
- Girouard SD, and Murphy GF. (2011). Melanoma stem cells: not rare, but well done. *Laboratory Investigation* **91**: 647–664.

- Giuliano S, Cheli Y, Ohanna M, Bonet C, Beuret L, Bille K, *et al.* (2010). Microphthalmia-associated transcription factor controls the DNA damage response and a lineage-specific senescence program in melanomas. *Cancer Res.* **70**: 3813–3822.
- Giussani P, Maceyka M, Le Stunff H, Mikami A, Lépine S, Wang E, *et al.* (2006). Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase regulates endoplasmic reticulum-to-golgi trafficking of ceramide. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 5055–5069.
- Gleave M, Hsieh JT, Gao CA, von Eschenbach AC, and Chung LW. (1991). Acceleration of human prostate cancer growth in vivo by factors produced by prostate and bone fibroblasts. *Cancer Res.* **51**: 3753–3761.
- Goel VK, Ibrahim N, Jiang G, Singhal M, Fee S, Flotte T, *et al.* (2009). Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. *Oncogene* **28**: 2289–2298.
- Gonzalez-Cabrera PJ, Jo E, Sanna MG, Brown S, Leaf N, Marsolais D, *et al.* (2008). Full pharmacological efficacy of a novel S1P1 agonist that does not require S1P-like headgroup interactions. *Mol. Pharmacol.* **74**: 1308–1318.
- Goodemote KA, Mattie ME, Berger A, and Spiegel S. (1995). Involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein in the mitogenic signaling pathways of sphingosine 1-phosphate. *J. Biol. Chem.* **270**: 10272–10277.
- Grabski AD, Shimizu T, Deou J, Mahoney WM Jr, Reidy MA, and Daum G. (2009). Sphingosine-1-phosphate receptor-2 regulates expression of smooth muscle alpha-actin after arterial injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**: 1644–1650.
- Gräler MH, and Goetzl EJ. (2004). The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors. *FASEB J.* **18**: 551–553.
- Griner EM, and Kazanietz MG. (2007). Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**: 281–294.
- Grossman D, and Altieri DC. (2001). Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets. *Cancer Metastasis Rev.* **20**: 3–11.
- Grum-Schwensen B, Klingelhofer J, Berg CH, El-Naaman C, Grigorian M, Lukanidin E, *et al.* (2005). Suppression of tumor development and metastasis formation in mice lacking the S100A4(mts1) gene. *Cancer Res.* **65**: 3772–3780.
- Guo L, and Wang X. (2012). Crosstalk between Phospholipase D and Sphingosine Kinase in Plant Stress Signaling. *Front Plant Sci* **3**: 51.
- Ha L, Ichikawa T, Anver M, Dickins R, Lowe S, Sharpless NE, *et al.* (2007). ARF functions as a melanoma tumor suppressor by inducing p53-independent senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**: 10968–10973.
- Hacker E, Irwin N, Muller HK, Powell MB, Kay G, Hayward N, *et al.* (2005). Neonatal ultraviolet radiation exposure is critical for malignant melanoma induction in pigmented Tpras transgenic mice. *J. Invest. Dermatol.* **125**: 1074–1077.

- Hacker E, Muller HK, Irwin N, Gabrielli B, Lincoln D, Pavey S, *et al.* (2006). Spontaneous and UV radiation-induced multiple metastatic melanomas in Cdk4R24C/R24C/TPras mice. *Cancer Res.* **66**: 2946–2952.
- Hait NC, Allegood J, Maceyka M, Strub GM, Harikumar KB, Singh SK, *et al.* (2009). Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science* **325**: 1254–1257.
- Hait NC, Bellamy A, Milstien S, Kordula T, and Spiegel S. (2007). Sphingosine kinase type 2 activation by ERK-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **282**: 12058–12065.
- Hait NC, Sarkar S, Le Stunff H, Mikami A, Maceyka M, Milstien S, *et al.* (2005). Role of sphingosine kinase 2 in cell migration toward epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **280**: 29462–29469.
- Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M, *et al.* (2003). Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* **426**: 803–809.
- Hänel P, Andréani P, and Gräler MH. (2007). Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB J.* **21**: 1202–1209.
- Hannun YA, and Obeid LM. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 139–150.
- Hasebe T, Sasaki S, Imoto S, Mukai K, Yokose T, and Ochiai A. (2002). Prognostic significance of fibrotic focus in invasive ductal carcinoma of the breast: a prospective observational study. *Mod. Pathol.* **15**: 502–516.
- Hasebe T, Tamura N, Okada N, Hojo T, Akashi-Tanaka S, Shimizu C, *et al.* (2010). p53 expression in tumor-stromal fibroblasts is closely associated with the nodal metastasis and outcome of patients with invasive ductal carcinoma who received neoadjuvant therapy. *Hum. Pathol.* **41**: 262–270.
- Hasegawa Y, Suzuki H, Sozen T, Rolland W, and Zhang JH. (2010). Activation of sphingosine 1-phosphate receptor-1 by FTY720 is neuroprotective after ischemic stroke in rats. *Stroke* **41**: 368–374.
- Hayashi S, Okada T, Igarashi N, Fujita T, Jahangeer S, and Nakamura S-I. (2002). Identification and characterization of RPK118, a novel sphingosine kinase-1-binding protein. *J. Biol. Chem.* **277**: 33319–33324.
- Heffernan-Stroud LA, Helke KL, Jenkins RW, De Costa A-M, Hannun YA, and Obeid LM. (2012). Defining a role for sphingosine kinase 1 in p53-dependent tumors. *Oncogene* **31**: 1166–1175.
- Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, Nourry A, Niculescu-Duvas I, Dhomen N, *et al.* (2010). Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* **140**: 209–221.
- Held MA, Curley DP, Dankort D, McMahan M, Muthusamy V, and Bosenberg MW. (2010). Characterization of melanoma cells capable of propagating tumors from a single cell. *Cancer Res.* **70**: 388–397.
- Hengst JA, Guilford JM, Fox TE, Wang X, Conroy EJ, and Yun JK. (2009). Sphingosine kinase 1 localized to the plasma membrane lipid raft microdomain overcomes serum deprivation induced growth inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* **492**: 62–73.



- Henriet P, Zhong ZD, Brooks PC, Weinberg KI, and DeClerck YA. (2000). Contact with fibrillar collagen inhibits melanoma cell proliferation by up-regulating p27KIP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 10026–10031.
- Heo K, Park K-A, Kim Y-H, Kim S-H, Oh Y-S, Kim I-H, *et al.* (2009). Sphingosine 1-phosphate induces vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells. *BMB Rep* **42**: 685–690.
- Herr DR, Fyrst H, Phan V, Heinecke K, Georges R, Harris GL, *et al.* (2003). Sply regulation of sphingolipid signaling molecules is essential for Drosophila development. *Development* **130**: 2443–2453.
- Hibbs K. (2004). Differential gene expression in ovarian carcinoma: identification of potential biomarkers. *Am. J. Pathol.* **165**: 397–314.
- Hill R, Song Y, Cardiff RD, and Van Dyke T. (2005). Selective evolution of stromal mesenchyme with p53 loss in response to epithelial tumorigenesis. *Cell* **123**: 1001–1011.
- Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, *et al.* (2002). MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* **2**: 289–300.
- Hisano Y, Kobayashi N, Kawahara A, Yamaguchi A, and Nishi T. (2011). The sphingosine 1-phosphate transporter, SPNS2, functions as a transporter of the phosphorylated form of the immunomodulating agent FTY720. *J. Biol. Chem.* **286**: 1758–1766.
- Hla T, Lee MJ, Ancellin N, Paik JH, and Kluk MJ. (2001). Lysophospholipids--receptor revelations. *Science* **294**: 1875–1878.
- Hla T, and Maciag T. (1990). An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **265**: 9308–9313.
- Hla T. (2003). Signaling and biological actions of sphingosine 1-phosphate. *Pharmacol. Res.* **47**: 401–407.
- Hobson JP, Rosenfeldt HM, Barak LS, Olivera A, Poulton S, Caron MG, *et al.* (2001). Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science* **291**: 1800–1803.
- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, *et al.* (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **363**: 711–723.
- Hoek KS, and Goding CR. (2010). Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* **23**: 746–759.
- Hofheinz R-D, al-Batran S-E, Hartmann F, Hartung G, Jäger D, Renner C, *et al.* (2003). Stromal antigen targeting by a humanised monoclonal antibody: an early phase II trial of sibrotuzumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Onkologie* **26**: 44–48.
- Hofmann UB, Eggert AAO, Blass K, Bröcker E-B, and Becker JC. (2003). Expression of matrix metalloproteinases in the microenvironment of spontaneous and experimental melanoma metastases reflects the requirements for tumor formation. *Cancer Res.* **63**: 8221–8225.

- Hofmann UB, Houben R, Bröcker E-B, and Becker JC. (2005). Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie* **87**: 307–314.
- Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN, and Ruiter DJ. (2000).(a). Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **115**: 337–344.
- Hofmann UB, Westphal JR, Waas ET, Zendman AJ, Cornelissen IM, Ruiter DJ, *et al.* (1999). Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. *Br. J. Cancer* **81**: 774–782.
- Hofmann UB, Westphal JR, Zendman AJ, Becker JC, Ruiter DJ, and van Muijen GN. (2000).(b). Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression. *J. Pathol.* **191**: 245–256.
- Holleran WM, Takagi Y, and Uchida Y. (2006). Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS Lett.* **580**: 5456–5466.
- Holman CD, Armstrong BK, and Heenan PJ. (1983). A theory of the etiology and pathogenesis of human cutaneous malignant melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **71**: 651–656.
- Hornyak TJ, Jiang S, Guzmán EA, Scissors BN, Tuchinda C, He H, *et al.* (2009). Mitf dosage as a primary determinant of melanocyte survival after ultraviolet irradiation. *Pigment Cell Melanoma Res* **22**: 307–318.
- Hsu M, Andl T, Li G, Meinkoth JL, and Herlyn M. (2000).(a). Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J. Cell. Sci.* **113 ( Pt 9)**: 1535–1542.
- Hsu M-Y, Meier F, and Herlyn M. (2002). Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation* **70**: 522–536.
- Hsu MY, Meier FE, Nesbit M, Hsu JY, Van Belle P, Elder DE, *et al.* (2000).(b). E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am. J. Pathol.* **156**: 1515–1525.
- Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, and Herlyn M. (1996). Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **1**: 188–194.
- Huang H-D, Lee T-Y, Tzeng S-W, and Horng J-T. (2005). KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites. *Nucleic Acids Res.* **33**: W226–229.
- Huang Y-L, Huang W-P, and Lee H. (2011). Roles of sphingosine 1-phosphate on tumorigenesis. *World J Biol Chem* **2**: 25–34.
- Huijbers IJ, Krimpenfort P, Chomez P, van der Valk MA, Song J-Y, Inderberg-Suso E-M, *et al.* (2006). An inducible mouse model of melanoma expressing a defined tumor antigen. *Cancer Res.* **66**: 3278–3286.
- Husain Z, Pathak MA, Flotte T, and Wick MM. (1991). Role of ultraviolet radiation in the induction of melanocytic tumors in hairless mice following 7,12-dimethylbenz(a)anthracene application and ultraviolet irradiation. *Cancer Res.* **51**: 4964–4970.

- Hussein MR. (2005). Transforming growth factor-beta and malignant melanoma: molecular mechanisms. *J. Cutan. Pathol.* **32**: 389–395.
- Hutton JJ, Jegga AG, Kong S, Gupta A, Ebert C, Williams S, *et al.* (2004). Microarray and comparative genomics-based identification of genes and gene regulatory regions of the mouse immune system. *BMC Genomics* **5**: 82.
- Huwiler A, Bourquin F, Kotelevets N, Pastukhov O, Capitani G, Grütter MG, *et al.* (2011). A prokaryotic S1P lyase degrades extracellular S1P in vitro and in vivo: implication for treating hyperproliferative disorders. *PLoS ONE* **6**: e22436.
- Huwiler A, Döll F, Ren S, Klawitter S, Greening A, Römer I, *et al.* (2006). Histamine increases sphingosine kinase-1 expression and activity in the human arterial endothelial cell line EA.hy 926 by a PKC-alpha-dependent mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **1761**: 367–376.
- Hwang PH, Yi HK, Kim DS, Nam SY, Kim JS, and Lee DY. (2001). Suppression of tumorigenicity and metastasis in B16F10 cells by PTEN/MMAC1/TEP1 gene. *Cancer Lett.* **172**: 83–91.
- Ibrahim N, and Haluska FG. (2009). Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Annu Rev Pathol* **4**: 551–579.
- Igarashi J, Erwin PA, Dantas APV, Chen H, and Michel T. (2003). VEGF induces S1P1 receptors in endothelial cells: Implications for cross-talk between sphingolipid and growth factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 10664–10669.
- Igney FH, and Krammer PH. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* **2**: 277–288.
- Ikeda M, Kihara A, and Igarashi Y. (2004). Sphingosine-1-phosphate lyase SPL is an endoplasmic reticulum-resident, integral membrane protein with the pyridoxal 5'-phosphate binding domain exposed to the cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**: 338–343.
- Ikeya M, Lee SM, Johnson JE, McMahon AP, and Takada S. (1997). Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature* **389**: 966–970.
- Im DS, Heise CE, Ancellin N, O'Dowd BF, Shei GJ, Heavens RP, *et al.* (2000). Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8. *J. Biol. Chem.* **275**: 14281–14286.
- Imasawa T, Koike K, Ishii I, Chun J, and Yatomi Y. (2010). Blockade of sphingosine 1-phosphate receptor 2 signaling attenuates streptozotocin-induced apoptosis of pancreatic beta-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **392**: 207–211.
- Inagaki Y, Pham TT, Fujiwara Y, Kohno T, Osborne DA, Igarashi Y, *et al.* (2005). Sphingosine 1-phosphate analogue recognition and selectivity at S1P4 within the endothelial differentiation gene family of receptors. *Biochem. J.* **389**: 187–195.
- Inoue-Narita T, Hamada K, Sasaki T, Hatakeyama S, Fujita S, Kawahara K, *et al.* (2008). Pten deficiency in melanocytes results in resistance to hair graying and susceptibility to carcinogen-induced melanomagenesis. *Cancer Res.* **68**: 5760–5768.
- Ishii I, Ye X, Friedman B, Kawamura S, Contos JJA, Kingsbury MA, *et al.* (2002). Marked perinatal lethality and cellular signaling deficits in mice null for the two sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors, S1P(2)/LP(B2)/EDG-5 and S1P(3)/LP(B3)/EDG-3. *J. Biol. Chem.* **277**: 25152–25159.

- Ito H, Yoshida K, Murakami M, Hagiwara K, Sasaki N, Kobayashi M, *et al.* (2011). Heterogeneous sphingosine-1-phosphate lyase gene expression and its regulatory mechanism in human lung cancer cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* **1811**: 119–128.
- Ito K, Anada Y, Tani M, Ikeda M, Sano T, Kihara A, *et al.* (2007). Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357**: 212–217.
- Itoh T, Tanioka M, Matsuda H, Nishimoto H, Yoshioka T, Suzuki R, *et al.* (1999). Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. *Clin. Exp. Metastasis* **17**: 177–181.
- Iwamoto T, Takahashi M, Ito M, Hamatani K, Ohbayashi M, Wajjwalku W, *et al.* (1991). Aberrant melanogenesis and melanocytic tumour development in transgenic mice that carry a metallothionein/ret fusion gene. *EMBO J.* **10**: 3167–3175.
- Janji B, Melchior C, Gouon V, Vallar L, and Kieffer N. (1999). Autocrine TGF-beta-regulated expression of adhesion receptors and integrin-linked kinase in HT-144 melanoma cells correlates with their metastatic phenotype. *Int. J. Cancer* **83**: 255–262.
- Jarman KE, Moretti PAB, Zebol JR, and Pitson SM. (2010). Translocation of sphingosine kinase 1 to the plasma membrane is mediated by calcium- and integrin-binding protein 1. *J. Biol. Chem.* **285**: 483–492.
- Jarrett SG, Novak M, Harris N, Merlino G, Slominski A, and Kaetzel DM. (2012). NM23 deficiency promotes metastasis in a UV radiation-induced mouse model of human melanoma. *Clinical & experimental metastasis*.
- Javelaud D, Alexaki V-I, and Mauviel A. (2008). Transforming growth factor-beta in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* **21**: 123–132.
- Jenne CN, Enders A, Rivera R, Watson SR, Bankovich AJ, Pereira JP, *et al.* (2009). T-bet-dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow. *J. Exp. Med.* **206**: 2469–2481.
- Jin Z-Q, Goetzl EJ, and Karliner JS. (2004). Sphingosine kinase activation mediates ischemic preconditioning in murine heart. *Circulation* **110**: 1980–1989.
- Jo E, Sanna MG, Gonzalez-Cabrera PJ, Thangada S, Tigyi G, Osborne DA, *et al.* (2005). S1P1-selective in vivo-active agonists from high-throughput screening: off-the-shelf chemical probes of receptor interactions, signaling, and fate. *Chem. Biol.* **12**: 703–715.
- Johnson KR, Johnson KY, Becker KP, Bielawski J, Mao C, and Obeid LM. (2003). Role of human sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 in the regulation of intra- and extracellular sphingosine-1-phosphate levels and cell viability. *J. Biol. Chem.* **278**: 34541–34547.
- Johnson KR. (2005). Immunohistochemical distribution of sphingosine kinase 1 in normal and tumour lung tissue. *J. Histochem. Cytochem.* **53**: 1159–1166.
- Jolly PS, Bektas M, Olivera A, Gonzalez-Espinosa C, Proia RL, Rivera J, *et al.* (2004). Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by FcepsilonRI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis. *J. Exp. Med.* **199**: 959–970.
- Kalluri R, and Zeisberg M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**: 392–401.

- Kannan K, Sharpless NE, Xu J, O'Hagan RC, Bosenberg M, and Chin L. (2003). Components of the Rb pathway are critical targets of UV mutagenesis in a murine melanoma model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 1221–1225.
- Kano-Sueoka T, Cohen DM, Yamaizumi Z, Nishimura S, Mori M, and Fujiki H. (1979). Phosphoethanolamine as a growth factor of a mammary carcinoma cell line of rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 5741–5744.
- Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, *et al.* (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* **438**: 820–827.
- Kariya Y, Kihara A, Ikeda M, Kikuchi F, Nakamura S, Hashimoto S, *et al.* (2005). Products by the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate (S1P) lyase pathway but not S1P stimulate mitogenesis. *Genes Cells* **10**: 605–615.
- Kato M, Liu W, Akhand AA, Hossain K, Takeda K, Takahashi M, *et al.* (2000). Ultraviolet radiation induces both full activation of ret kinase and malignant melanocytic tumor promotion in RFP-RET-transgenic mice. *J. Invest. Dermatol.* **115**: 1157–1158.
- Kato M, Takahashi M, Akhand AA, Liu W, Dai Y, Shimizu S, *et al.* (1998). Transgenic mouse model for skin malignant melanoma. *Oncogene* **17**: 1885–1888.
- Kawahara A, Nishi T, Hisano Y, Fukui H, Yamaguchi A, and Mochizuki N. (2009). The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. *Science* **323**: 524–527.
- Kawamori T, Kaneshiro T, Okumura M, Maalouf S, Uflacker A, Bielawski J, *et al.* (2009). Role for sphingosine kinase 1 in colon carcinogenesis. *FASEB J* **23**: 405–414.
- Kawamori T, Osta W, Johnson KR, Pettus BJ, Bielawski J, Tanaka T, *et al.* (2006). Sphingosine kinase 1 is up-regulated in colon carcinogenesis. *FASEB J.* **20**: 386–388.
- Keller CD, Rivera Gil P, Tölle M, van der Giet M, Chun J, Radeke HH, *et al.* (2007). Immunomodulator FTY720 induces myofibroblast differentiation via the lysophospholipid receptor S1P3 and Smad3 signaling. *Am. J. Pathol.* **170**: 281–292.
- Kelsall SR, and Mintz B. (1998). Metastatic cutaneous melanoma promoted by ultraviolet radiation in mice with transgene-initiated low melanoma susceptibility. *Cancer Res.* **58**: 4061–4065.
- Kharel Y, Lee S, Snyder AH, Sheasley-O'neill SL, Morris MA, Setiady Y, *et al.* (2005). Sphingosine kinase 2 is required for modulation of lymphocyte traffic by FTY720. *J. Biol. Chem* **280**: 36865–36872.
- Kharel Y, Raje M, Gao M, Gellett AM, Tomsig JL, Lynch KR, *et al.* (2012). Sphingosine kinase type 2 inhibition elevates circulating sphingosine 1-phosphate. *Biochem. J.* **447**: 149–157.
- Kiaris H, Chatzistamou I, Trimis G, Frangou-Plemmenou M, Pafiti-Kondi A, and Kalofoutis A. (2005). Evidence for nonautonomous effect of p53 tumor suppressor in carcinogenesis. *Cancer Res.* **65**: 1627–1630.

- Kihara A, Anada Y, and Igarashi Y. (2006). Mouse sphingosine kinase isoforms SPHK1a and SPHK1b differ in enzymatic traits including stability, localization, modification, and oligomerization. *J. Biol. Chem.* **281**: 4532–4539.
- Kim E-S, Kim J-S, Kim SG, Hwang S, Lee CH, and Moon A. (2011). Sphingosine 1-phosphate regulates matrix metalloproteinase-9 expression and breast cell invasion through S1P3-Gαq coupling. *J. Cell. Sci.* **124**: 2220–2230.
- Kirkwood JM, Bastholt L, Robert C, Sosman J, Larkin J, Hersey P, *et al.* (2012). Phase II, open-label, randomized trial of the MEK1/2 inhibitor selumetinib as monotherapy versus temozolomide in patients with advanced melanoma. *Clin. Cancer Res.* **18**: 555–567.
- Kiss Z, Mukherjee JJ, Crilly KS, and Chung T. (1997). Ethanolamine, but not phosphoethanolamine, potentiates the effects of insulin, phosphocholine, and ATP on DNA synthesis in NIH 3T3 cells—role of mitogen-activated protein-kinase-dependent and protein-kinase-independent mechanisms. *Eur. J. Biochem.* **250**: 395–402.
- Klein-Szanto A, Bradl M, Porter S, and Mintz B. (1991). Melanosis and associated tumors in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 169–173.
- Klein-Szanto AJ, Silvers WK, and Mintz B. (1994). Ultraviolet radiation-induced malignant skin melanoma in melanoma-susceptible transgenic mice. *Cancer Res.* **54**: 4569–4572.
- Kligman LH, and Elenitsas R. (2001). Melanoma induction in a hairless mouse with short-term application of dimethylbenz[a]anthracene. *Melanoma Res.* **11**: 319–324.
- Klionsky DJ, and Emr SD. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **290**: 1717–1721.
- Kluk MJ, and Hla T. (2002). Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1582**: 72–80.
- Kohno M. (2006). Intracellular role for sphingosine kinase 1 in intestinal adenoma cell proliferation. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 7211–7223.
- Kono M, Belyantseva IA, Skoura A, Frolenkov GI, Starost MF, Dreier JL, *et al.* (2007).(a). Deafness and stria vascularis defects in S1P2 receptor-null mice. *J. Biol. Chem.* **282**: 10690–10696.
- Kono M, Mi Y, Liu Y, Sasaki T, Allende ML, Wu Y-P, *et al.* (2004). The sphingosine-1-phosphate receptors S1P1, S1P2, and S1P3 function coordinately during embryonic angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **279**: 29367–29373.
- Kono Y, Nishiuma T, Nishimura Y, Kotani Y, Okada T, Nakamura S-I, *et al.* (2007).(b). Sphingosine kinase 1 regulates differentiation of human and mouse lung fibroblasts mediated by TGF-beta1. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **37**: 395–404.
- van Koppen CJ, Meyer zu Heringdorf D, Alemany R, and Jakobs KH. (2001). Sphingosine kinase-mediated calcium signaling by muscarinic acetylcholine receptors. *Life Sci.* **68**: 2535–2540.
- Kothapalli R, Kusmartseva I, and Loughran TP. (2002). Characterization of a human sphingosine-1-phosphate receptor gene (S1P5) and its differential expression in LGL leukemia. *Biochim. Biophys. Acta* **1579**: 117–123.

- Krimpenfort P, Quon KC, Mooi WJ, Loonstra A, and Berns A. (2001). Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* **413**: 83–86.
- Krump-Konvalinkova V, Yasuda S, Rubic T, Makarova N, Mages J, Erl W, *et al.* (2005). Stable knock-down of the sphingosine 1-phosphate receptor S1P1 influences multiple functions of human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**: 546–552.
- Kumar A, Byun H-S, Bittman R, and Saba JD. (2011). The sphingolipid degradation product trans-2-hexadecenal induces cytoskeletal reorganization and apoptosis in a JNK-dependent manner. *Cell. Signal.* **23**: 1144–1152.
- Kumar A, and Saba JD. (2009). Lyase to live by: sphingosine phosphate lyase as a therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets* **13**: 1013–1025.
- Kumasaka MY, Yajima I, Hossain K, Iida M, Tsuzuki T, Ohno T, *et al.* (2010). A novel mouse model for de novo Melanoma. *Cancer Res.* **70**: 24–29.
- Kunisada T, Lu SZ, Yoshida H, Nishikawa S, Nishikawa S, Mizoguchi M, *et al.* (1998). Murine cutaneous mastocytosis and epidermal melanocytosis induced by keratinocyte expression of transgenic stem cell factor. *J. Exp. Med.* **187**: 1565–1573.
- Kunisada T, Yamazaki H, Hirobe T, Kamei S, Omoteno M, Tagaya H, *et al.* (2000). Keratinocyte expression of transgenic hepatocyte growth factor affects melanocyte development, leading to dermal melanocytosis. *Mech. Dev.* **94**: 67–78.
- Kuphal S, Bauer R, and Bosserhoff A-K. (2005). Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* **24**: 195–222.
- Kupperman E, An S, Osborne N, Waldron S, and Stainier DY. (2000). A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development. *Nature* **406**: 192–195.
- Kurschat P, Zigrino P, Nischt R, Breitkopf K, Steurer P, Klein CE, *et al.* (1999). Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 regulates matrix metalloproteinase-2 activation by modulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity in high and low invasive melanoma cell lines. *J. Biol. Chem.* **274**: 21056–21062.
- Lacaná E, Maceyka M, Milstien S, and Spiegel S. (2002). Cloning and characterization of a protein kinase A anchoring protein (AKAP)-related protein that interacts with and regulates sphingosine kinase 1 activity. *J. Biol. Chem.* **277**: 32947–32953.
- LaMontagne K, Littlewood-Evans A, Schnell C, O'Reilly T, Wyder L, Sanchez T, *et al.* (2006). Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization. *Cancer Res.* **66**: 221–231.
- Lan HY. (2011). Diverse roles of TGF- $\beta$ /Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int. J. Biol. Sci.* **7**: 1056–1067.
- LaPlant KD, and Louzon PD. (2010). Pazopanib: an oral multitargeted tyrosine kinase inhibitor for use in renal cell carcinoma. *Ann Pharmacother* **44**: 1054–1060.

- Larue L, Dougherty N, and Mintz B. (1992). Genetic predisposition of transgenic mouse melanocytes to melanoma results in malignant melanoma after exposure to a low ultraviolet B intensity nontumorigenic for normal melanocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 9534–9538.
- Lavieu G, Scarlatti F, Sala G, Carpentier S, Levade T, Ghidoni R, *et al.* (2006). Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation. *J. Biol. Chem.* **281**: 8518–8527.
- Lavieu G, Scarlatti F, Sala G, Levade T, Ghidoni R, Botti J, *et al.* (2007). Is autophagy the key mechanism by which the sphingolipid rheostat controls the cell fate decision? *Autophagy* **3**: 45–47.
- Lázár-Molnár E, Hegyesi H, Tóth S, and Falus A. (2000). Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* **12**: 547–554.
- LeBeau AM, Brennen WN, Aggarwal S, and Denmeade SR. (2009). Targeting the cancer stroma with a fibroblast activation protein-activated promelittin protoxin. *Mol. Cancer Ther.* **8**: 1378–1386.
- Leclercq TM, Moretti PAB, Vadas MA, and Pitson SM. (2008). Eukaryotic elongation factor 1A interacts with sphingosine kinase and directly enhances its catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **283**: 9606–9614.
- Lederle W, Hartenstein B, Meides A, Kunzelmann H, Werb Z, Angel P, *et al.* (2010). MMP13 as a stromal mediator in controlling persistent angiogenesis in skin carcinoma. *Carcinogenesis* **31**: 1175–1184.
- Lee JT, and Herlyn M. (2007). Microenvironmental influences in melanoma progression. *J. Cell. Biochem.* **101**: 862–872.
- Lee MJ, Van Brocklyn JR, Thangada S, Liu CH, Hand AR, Menzeleev R, *et al.* (1998). Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science* **279**: 1552–1555.
- Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, *et al.* (1999). Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* **99**: 301–312.
- Lee MJ, Thangada S, Paik JH, Sapkota GP, Ancellin N, Chae SS, *et al.* (2001). Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Mol. Cell* **8**: 693–704.
- Lee Y-S, Choi K-M, Lee S, Sin D-M, Lim Y, Lee Y-M, *et al.* (2012). Myriocin, a serine palmitoyltransferase inhibitor, suppresses tumor growth in a murine melanoma model by inhibiting de novo sphingolipid synthesis. *Cancer Biol. Ther.* **13**: 92–100.
- Lépine S, Allegood JC, Edmonds Y, Milstien S, and Spiegel S. (2011).(a). Autophagy induced by deficiency of sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase 1 is switched to apoptosis by calpain-mediated autophagy-related gene 5 (Atg5) cleavage. *J. Biol. Chem.* **286**: 44380–44390.
- Lépine S, Allegood JC, Park M, Dent P, Milstien S, and Spiegel S. (2011).(b). Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase-1 regulates ER stress-induced autophagy. *Cell Death Differ.* **18**: 350–361.



- Lepley D, Paik J-H, Hla T, and Ferrer F. (2005). The G protein-coupled receptor S1P2 regulates Rho/Rho kinase pathway to inhibit tumor cell migration. *Cancer Res.* **65**: 3788–3795.
- Li G, Foote C, Alexander S, and Alexander H. (2001).(a). Sphingosine-1-phosphate lyase has a central role in the development of *Dictyostelium discoideum*. *Development* **128**: 3473–3483.
- Li G, Satyamoorthy K, and Herlyn M. (2001).(b). N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res.* **61**: 3819–3825.
- Li G, Satyamoorthy K, Meier F, Berking C, Bogenrieder T, and Herlyn M. (2003). Function and regulation of melanoma-stromal fibroblast interactions: when seeds meet soil. *Oncogene* **22**: 3162–3171.
- Li G, Schaidler H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, Hashimoto K, and Herlyn M. (2001).(c). Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* **20**: 8125–8135.
- Li J. (2008). Clinical significance of sphingosine kinase-1 expression in human astrocytomas progression and overall patient survival. *Clin. Cancer Res.* **14**: 6996–7003.
- Li L, Fukunaga-Kalabis M, and Herlyn M. (2011). The three-dimensional human skin reconstruct model: a tool to study normal skin and melanoma progression. *J Vis Exp [Internet]*. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21847077>
- Li M-H, Sanchez T, Yamase H, Hla T, Oo ML, Pappalardo A, *et al.* (2009).(a). S1P/S1P1 signaling stimulates cell migration and invasion in Wilms tumor. *Cancer Lett.* **276**: 171–179.
- Li W, Yu C-P, Xia J, Zhang L, Weng G-X, Zheng H, *et al.* (2009).(b). Sphingosine kinase 1 is associated with gastric cancer progression and poor survival of patients. *Clin. Cancer Res.* **15**: 1393–1399.
- Li X, Regezi J, Ross FP, Blystone S, Ilić D, Leong SP, *et al.* (2001).(d). Integrin alphavbeta3 mediates K1735 murine melanoma cell motility in vivo and in vitro. *J. Cell. Sci.* **114**: 2665–2672.
- Lin JY, and Fisher DE. (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* **445**: 843–850.
- Lindsay CR, Lawn S, Campbell AD, Faller WJ, Rambow F, Mort RL, *et al.* (2011). P-Rex1 is required for efficient melanoblast migration and melanoma metastasis. *Nat Commun* **2**: 555.
- Liu B, Earl HM, Baban D, Shoaibi M, Fabra A, Kerr DJ, *et al.* (1995). Melanoma cell lines express VEGF receptor KDR and respond to exogenously added VEGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**: 721–727.
- Liu F, Verin AD, Wang P, Day R, Wersto RP, Chrest FJ, *et al.* (2001). Differential regulation of sphingosine-1-phosphate- and VEGF-induced endothelial cell chemotaxis. Involvement of G(ialpha2)-linked Rho kinase activity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **24**: 711–719.
- Liu H, Sugiura M, Nava VE, Edsall LC, Kono K, Poulton S, *et al.* (2000).(a). Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J. Biol. Chem* **275**: 19513–19520.
- Liu H, Toman RE, Goparaju SK, Maceyka M, Nava VE, Sankala H, *et al.* (2003). Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* **278**: 40330–40336.

- Liu X, Zhang Q-H, and Yi G-H. (2012). Regulation of metabolism and transport of sphingosine-1-phosphate in mammalian cells. *Mol. Cell. Biochem.* **363**: 21–33.
- Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, Hobson JP, *et al.* (2000).(b). Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J. Clin. Invest.* **106**: 951–961.
- Lo RS, and Witte ON. (2008). Transforming growth factor-beta activation promotes genetic context-dependent invasion of immortalized melanocytes. *Cancer Res.* **68**: 4248–4257.
- Long JS, Fujiwara Y, Edwards J, Tannahill CL, Tigyi G, Pyne S, *et al.* (2010). Sphingosine 1-phosphate receptor 4 uses HER2 (ERBB2) to regulate extracellular signal regulated kinase-1/2 in MDA-MB-453 breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **285**: 35957–35966.
- Loveridge C, Tonelli F, Leclercq T, Lim KG, Long JS, Berdyshev E, *et al.* (2010). The sphingosine kinase 1 inhibitor 2-(p-hydroxyanilino)-4-(p-chlorophenyl)thiazole induces proteasomal degradation of sphingosine kinase 1 in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **285**: 38841–38852.
- Lynch KR, and Macdonald TL. (2008). Sphingosine 1-phosphate chemical biology. *Biochim. Biophys. Acta* **1781**: 508–512.
- MacDougall JR, Bani MR, Lin Y, Muschel RJ, and Kerbel RS. (1999). ‘Proteolytic switching’: opposite patterns of regulation of gelatinase B and its inhibitor TIMP-1 during human melanoma progression and consequences of gelatinase B overexpression. *Br. J. Cancer* **80**: 504–512.
- Maceyka M, Alvarez SE, Milstien S, and Spiegel S. (2008). Filamin A links sphingosine kinase 1 and sphingosine-1-phosphate receptor 1 at lamellipodia to orchestrate cell migration. *Mol. Cell. Biol.* **28**: 5687–5697.
- Maceyka M, Harikumar KB, Milstien S, and Spiegel S. (2012). Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol.* **22**: 50–60.
- Maceyka M, Nava VE, Milstien S, and Spiegel S. (2004). Aminoacylase 1 is a sphingosine kinase 1-interacting protein. *FEBS Lett.* **568**: 30–34.
- Maceyka M, Payne SG, Milstien S, and Spiegel S. (2002). Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1585**: 193–201.
- Maceyka M, Sankala H, Hait NC, Le Stunff H, Liu H, Toman R, *et al.* (2005). SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J. Biol. Chem.* **280**: 37118–37129.
- MacLennan AJ, Carney PR, Zhu WJ, Chaves AH, Garcia J, Grimes JR, *et al.* (2001). An essential role for the H218/AGR16/Edg-5/LP(B2) sphingosine 1-phosphate receptor in neuronal excitability. *Eur. J. Neurosci.* **14**: 203–209.
- Madhunapantula SV, Hengst J, Gowda R, Fox TE, Yun JK, and Robertson GP. (2012). Targeting sphingosine kinase-1 to inhibit melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* **25**: 259–274.
- Madhunapantula SV, and Robertson GP. (2009). The PTEN-AKT3 signaling cascade as a therapeutic target in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* **22**: 400–419.

- Maehara N, Matsumoto K, Kuba K, Mizumoto K, Tanaka M, and Nakamura T. (2001). NK4, a four-kringle antagonist of HGF, inhibits spreading and invasion of human pancreatic cancer cells. *Br. J. Cancer* **84**: 864–873.
- Mahabeleshwar GH, and Byzova TV. (2007). Angiogenesis in melanoma. *Semin. Oncol.* **34**: 555–565.
- Maines LW, Fitzpatrick LR, French KJ, Zhuang Y, Xia Z, Keller SN, *et al.* (2008). Suppression of ulcerative colitis in mice by orally available inhibitors of sphingosine kinase. *Dig. Dis. Sci.* **53**: 997–1012.
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, and Kroemer G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 741–752.
- Majmundar AJ, Wong WJ, and Simon MC. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol. Cell* **40**: 294–309.
- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, *et al.* (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am. J. Pathol.* **155**: 739–752.
- Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, *et al.* (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* **427**: 355–360.
- Mechtcheriakova D, Wlachos A, Sobanov J, Kopp T, Reuschel R, Bornancin F, *et al.* (2007). Sphingosine 1-phosphate phosphatase 2 is induced during inflammatory responses. *Cell. Signal.* **19**: 748–760.
- melanome-patients.fr | Melanome-patients.info. melanome-patients.fr | Melanome-patients.info. Available from: <http://www.melanome-patients.fr/pageArticle.php?idArticle=2>
- Melendez AJ, Carlos-Dias E, Gosink M, Allen JM, and Takacs L. (2000). Human sphingosine kinase: molecular cloning, functional characterization and tissue distribution. *Gene* **251**: 19–26.
- Melendez AJ, and Khaw AK. (2002). Dichotomy of Ca<sup>2+</sup> signals triggered by different phospholipid pathways in antigen stimulation of human mast cells. *J. Biol. Chem.* **277**: 17255–17262.
- Mendel J, Heinecke K, Fyrst H, and Saba JD. (2003). Sphingosine phosphate lyase expression is essential for normal development in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **278**: 22341–22349.
- Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**: 638–642.
- Michaloglou C, Vredeveld LCW, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CMAM, *et al.* (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**: 720–724.
- Micke P, and Ostman A. (2004). Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer* **45 Suppl 2**: S163–175.

- Milagre C, Dhomen N, Geyer FC, Hayward R, Lambros M, Reis-Filho JS, *et al.* (2010). A mouse model of melanoma driven by oncogenic KRAS. *Cancer Res.* **70**: 5549–5557.
- Miller AJ, and Mihm MC Jr. (2006). Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **355**: 51–65.
- Milstien S, and Spiegel S. (2006). Targeting sphingosine-1-phosphate: a novel avenue for cancer therapeutics. *Cancer Cell* **9**: 148–150.
- Min J, Van Veldhoven PP, Zhang L, Hanigan MH, Alexander H, and Alexander S. (2005). Sphingosine-1-phosphate lyase regulates sensitivity of human cells to select chemotherapy drugs in a p38-dependent manner. *Mol. Cancer Res.* **3**: 287–296.
- Mintz B, and Silvers WK. (1993). Transgenic mouse model of malignant skin melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 8817–8821.
- Mitra P, Payne SG, Milstien S, and Spiegel S. (2007). A rapid and sensitive method to measure secretion of sphingosine-1-phosphate. *Meth. Enzymol* **434**: 257–264.
- Monahan KB, Rozenberg GI, Krishnamurthy J, Johnson SM, Liu W, Bradford MK, *et al.* (2010). Somatic p16INK4a loss accelerates melanomagenesis. *Oncogene* **29**: 5809–5817.
- Mooi WJ, and Peeper DS. (2006). Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. *N. Engl. J. Med.* **355**: 1037–1046.
- Moschos SJ, Drogowski LM, Reppert SL, and Kirkwood JM. (2007). Integrins and cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* **21**: 13–20.
- Mueller MM, and Fusenig NE. (2004). Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **4**: 839–849.
- Mukhopadhyay D, Howell KS, Riezman H, and Capitani G. (2008). Identifying key residues of sphingosine-1-phosphate lyase for function in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* **283**: 20159–20169.
- Murakami M, Ichihara M, Sobue S, Kikuchi R, Ito H, Kimura A, *et al.* (2007). RET signaling-induced SPHK1 gene expression plays a role in both GDNF-induced differentiation and MEN2-type oncogenesis. *J. Neurochem.* **102**: 1585–1594.
- Muthusamy V, Hobbs C, Nogueira C, Cordon-Cardo C, McKee PH, Chin L, *et al.* (2006). Amplification of CDK4 and MDM2 in malignant melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* **45**: 447–454.
- Nagahashi M, Ramachandran S, Kim EY, Allegood JC, Rashid OM, Yamada A, *et al.* (2012). Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 1 promotes breast cancer progression by stimulating angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cancer Res.* **72**: 726–735.
- Nakade Y, Banno Y, T-Koizumi K, Hagiwara K, Sobue S, Koda M, *et al.* (2003). Regulation of sphingosine kinase 1 gene expression by protein kinase C in a human leukemia cell line, MEG-O1. *Biochim. Biophys. Acta* **1635**: 104–116.
- Nava VE, Lacana E, Poulton S, Liu H, Sugiura M, Kono K, *et al.* (2000). Functional characterization of human sphingosine kinase-1. *FEBS Lett.* **473**: 81–84.
- Nelson AA, and Tsao H. (2009). Melanoma and genetics. *Clin. Dermatol.* **27**: 46–52.

- Ng CK, Carr K, McAinsh MR, Powell B, and Hetherington AM. (2001). Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* **410**: 596–599.
- Niessner H, Beck D, Sinnberg T, Lasithiotakis K, Maczey E, Gogel J, *et al.* (2011). The farnesyl transferase inhibitor lonafarnib inhibits mTOR signaling and enforces sorafenib-induced apoptosis in melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* **131**: 468–479.
- Nikkola J, Vihinen P, Vlaykova T, Hahka-Kemppinen M, Kähäri V-M, and Pyrhönen S. (2002). High expression levels of collagenase-1 and stromelysin-1 correlate with shorter disease-free survival in human metastatic melanoma. *Int. J. Cancer* **97**: 432–438.
- Nikolaou VA, Stratigos AJ, Flaherty KT, and Tsao H. (2012). Melanoma: new insights and new therapies. *J. Invest. Dermatol.* **132**: 854–863.
- Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, Yoshida H, Osawa M, Moriyama M, *et al.* (2002). Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* **416**: 854–860.
- Nishimura EK. (2011). Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. *Pigment Cell & Melanoma Research* **24**: 401–410.
- Nogueira C, Kim K-H, Sung H, Paraiso KHT, Dannenberg J-H, Bosenberg M, *et al.* (2010). Cooperative interactions of PTEN deficiency and RAS activation in melanoma metastasis. *Oncogene* **29**: 6222–6232.
- Noonan FP, Otsuka T, Bang S, Anver MR, and Merlino G. (2000). Accelerated ultraviolet radiation-induced carcinogenesis in hepatocyte growth factor/scatter factor transgenic mice. *Cancer Res.* **60**: 3738–3743.
- Noonan FP, Recio JA, Takayama H, Duray P, Anver MR, Rush WL, *et al.* (2001). Neonatal sunburn and melanoma in mice. *Nature* **413**: 271–272.
- Ntayi C, Hornebeck W, and Bernard P. (2004). [Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) in cutaneous melanoma progression]. *Pathol. Biol.* **52**: 154–159.
- Ogretmen B, and Hannun YA. (2004). Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Cancer* **4**: 604–616.
- Ohmori T, Yang JL, Price JO, and Arteaga CL. (1998). Blockade of tumor cell transforming growth factor-betas enhances cell cycle progression and sensitizes human breast carcinoma cells to cytotoxic chemotherapy. *Exp. Cell Res.* **245**: 350–359.
- Ohotski J, Long JS, Orange C, Elsberger B, Mallon E, Doughty J, *et al.* (2012). Expression of sphingosine 1-phosphate receptor 4 and sphingosine kinase 1 is associated with outcome in oestrogen receptor negative breast cancer. *Br. J. Cancer* **107**: 756.
- Okamoto H, Takuwa N, Yokomizo T, Sugimoto N, Sakurada S, Shigematsu H, *et al.* (2000). Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 9247–9261.
- Olivera A, Kohama T, Edsall L, Nava V, Cuvillier O, Poulton S, *et al.* (1999). Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J. Cell Biol.* **147**: 545–558.

- Olivera A, Kohama T, Tu Z, Milstien S, and Spiegel S. (1998). Purification and characterization of rat kidney sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.* **273**: 12576–12583.
- Olivera A, Rosenthal J, and Spiegel S. (1996). Effect of acidic phospholipids on sphingosine kinase. *J. Cell. Biochem.* **60**: 529–537.
- Olivera A, Urtz N, Mizugishi K, Yamashita Y, Gilfillan AM, Furumoto Y, *et al.* (2006). IgE-dependent activation of sphingosine kinases 1 and 2 and secretion of sphingosine 1-phosphate requires Fyn kinase and contributes to mast cell responses. *J. Biol. Chem.* **281**: 2515–2525.
- Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, and Cunha GR. (1999). Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.* **59**: 5002–5011.
- OMS | Cancers cutanés. OMS | Cancers cutanés. WHO [Internet]. Available from: <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/fr/index1.html>
- van den Oord JJ, Paemen L, Opdenakker G, and de Wolf-Peeters C. (1997). Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin. *Am. J. Pathol.* **151**: 665–670.
- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, *et al.* (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* **121**: 335–348.
- Oskeritzian CA, Price MM, Hait NC, Kapitonov D, Falanga YT, Morales JK, *et al.* (2010). Essential roles of sphingosine-1-phosphate receptor 2 in human mast cell activation, anaphylaxis, and pulmonary edema. *J. Exp. Med.* **207**: 465–474.
- Oskouian B, Mendel J, Shocron E, Lee MA Jr, Fyrst H, and Saba JD. (2005). Regulation of sphingosine-1-phosphate lyase gene expression by members of the GATA family of transcription factors. *J. Biol. Chem.* **280**: 18403–18410.
- Oskouian B, Sooriyakumaran P, Borowsky AD, Crans A, Dillard-Telm L, Tam YY, *et al.* (2006). Sphingosine-1-phosphate lyase potentiates apoptosis via p53- and p38-dependent pathways and is down-regulated in colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **103**: 17384–17389.
- Ostman A, and Augsten M. (2009). Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**: 67–73.
- Otsuka T, Takayama H, Sharp R, Celli G, LaRochelle WJ, Bottaro DP, *et al.* (1998). c-Met autocrine activation induces development of malignant melanoma and acquisition of the metastatic phenotype. *Cancer Res.* **58**: 5157–5167.
- Paik JH, Chae Ss, Lee MJ, Thangada S, and Hla T. (2001). Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of alpha vbeta3- and beta1-containing integrins. *J. Biol. Chem.* **276**: 11830–11837.
- Paik J-H, Skoura A, Chae S-S, Cowan AE, Han DK, Proia RL, *et al.* (2004). Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization. *Genes Dev.* **18**: 2392–2403.

- Palmieri G, Capone M, Ascierto ML, Gentilcore G, Stroncek DF, Casula M, *et al.* (2009). Main roads to melanoma. *J Transl Med* **7**: 86.
- Pan S, Mi Y, Pally C, Beerli C, Chen A, Guerini D, *et al.* (2006). A monoselective sphingosine-1-phosphate receptor-1 agonist prevents allograft rejection in a stringent rat heart transplantation model. *Chem. Biol.* **13**: 1227–1234.
- Pankov R, and Yamada KM. (2002). Fibronectin at a glance. *J. Cell. Sci.* **115**: 3861–3863.
- Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, Xu Y, *et al.* (2007). Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science* **316**: 295–298.
- Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, and Gilchrist BA. (2009). Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**: 1493–1506.
- Parrill AL, Lima S, and Spiegel S. (2012). Structure of the first sphingosine 1-phosphate receptor. *Sci Signal* **5**: pe23.
- Parrill AL, Wang D, Bautista DL, Van Brocklyn JR, Lorincz Z, Fischer DJ, *et al.* (2000). Identification of Edg1 receptor residues that recognize sphingosine 1-phosphate. *J. Biol. Chem.* **275**: 39379–39384.
- Parrott JA, Nilsson E, Mosher R, Magrane G, Albertson D, Pinkel D, *et al.* (2001). Stromal-epithelial interactions in the progression of ovarian cancer: influence and source of tumor stromal cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **175**: 29–39.
- Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, Kopani KR, Amatruda JF, Murphey RD, *et al.* (2005). BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr. Biol.* **15**: 249–254.
- Pchejetski D, Böhler T, Stebbing J, and Waxman J. (2011). Therapeutic potential of targeting sphingosine kinase 1 in prostate cancer. *Nat Rev Urol* **8**: 569–678.
- Peter BF, Lidington D, Harada A, Bolz HJ, Vogel L, Heximer S, *et al.* (2008). Role of sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase 1 in the regulation of resistance artery tone. *Circ. Res.* **103**: 315–324.
- Petersen OW, Nielsen HL, Gudjonsson T, Villadsen R, Rank F, Niebuhr E, *et al.* (2003). Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *Am. J. Pathol.* **162**: 391–402.
- Petitclerc E, Strömblad S, von Schalscha TL, Mitjans F, Piulats J, Montgomery AM, *et al.* (1999). Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer Res.* **59**: 2724–2730.
- Pham THM, Baluk P, Xu Y, Grigorova I, Bankovich AJ, Pappu R, *et al.* (2010). Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning. *J. Exp. Med.* **207**: 17–27.
- Picard O, Rolland Y, and Poupon MF. (1986). Fibroblast-dependent tumorigenicity of cells in nude mice: implication for implantation of metastases. *Cancer Res.* **46**: 3290–3294.

- Pitson SM, D'andrea RJ, Vandeleur L, Moretti PA, Xia P, Gamble JR, *et al.* (2000). Human sphingosine kinase: purification, molecular cloning and characterization of the native and recombinant enzymes. *Biochem. J.* **350 Pt 2**: 429–441.
- Pitson SM, Moretti PAB, Zebol JR, Lynn HE, Xia P, Vadas MA, *et al.* (2003). Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation. *EMBO J.* **22**: 5491–5500.
- Pitson SM. (2011). Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling. *Trends Biochem. Sci.* **36**: 97–107.
- Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, *et al.* (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat. Genet.* **33**: 19–20.
- Ponnusamy S, Selvam SP, Mehrotra S, Kawamori T, Snider AJ, Obeid LM, *et al.* (2012). Communication between host organism and cancer cells is transduced by systemic sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signalling to regulate tumour metastasis. *EMBO Mol Med* **4**: 761–775.
- Powell MB, Hyman P, Bell OD, Balmain A, Brown K, Alberts D, *et al.* (1995). Hyperpigmentation and melanocytic hyperplasia in transgenic mice expressing the human T24 HA-ras gene regulated by a mouse tyrosinase promoter. *Molecular Carcinogenesis* **12**: 82–90.
- Puneet P, Yap CT, Wong L, Lam Y, Koh DR, Moochhala S, *et al.* (2010). SphK1 regulates proinflammatory responses associated with endotoxin and polymicrobial sepsis. *Science* **328**: 1290–1294.
- Pushparaj PN, Manikandan J, Tay HK, H'ng SC, Kumar SD, Pfeilschifter J, *et al.* (2009). Sphingosine kinase 1 is pivotal for Fc epsilon RI-mediated mast cell signaling and functional responses in vitro and in vivo. *J. Immunol.* **183**: 221–227.
- Puzanov I, and Flaherty KT. (2010). Targeted molecular therapy in melanoma. *Semin Cutan Med Surg* **29**: 196–201.
- Pyne NJ, and Pyne S. (2010). Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat Rev Cancer [Internet]*. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/20555359>
- Pyne S, Lee SC, Long J, and Pyne NJ. (2009). Role of sphingosine kinases and lipid phosphate phosphatases in regulating spatial sphingosine 1-phosphate signalling in health and disease. *Cell. Signal.* **21**: 14–21.
- Pyne S, and Pyne NJ. (2011). Translational aspects of sphingosine 1-phosphate biology. *Trends Mol Med* **17**: 463–472.
- Qin W, Pappan K, and Wang X. (1997). Molecular heterogeneity of phospholipase D (PLD). Cloning of PLDgamma and regulation of plant PLDgamma, -beta, and -alpha by polyphosphoinositides and calcium. *J. Biol. Chem.* **272**: 28267–28273.
- Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, and Morrison SJ. (2008). Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* **456**: 593–598.
- Ramirez RD, D'Atri S, Pagani E, Faraggiana T, Lacal PM, Taylor RS, *et al.* (1999). Progressive increase in telomerase activity from benign melanocytic conditions to malignant melanoma. *Neoplasia* **1**: 42–49.



- Räsänen K, and Vaheri A. (2010). Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp. Cell Res.* **316**: 2713–2722.
- Recio JA, Noonan FP, Takayama H, Anver MR, Duray P, Rush WL, *et al.* (2002). Ink4a/arf deficiency promotes ultraviolet radiation-induced melanomagenesis. *Cancer Res.* **62**: 6724–6730.
- Reiss U, Oskouian B, Zhou J, Gupta V, Sooriyakumaran P, Kelly S, *et al.* (2004). Sphingosine-phosphate lyase enhances stress-induced ceramide generation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**: 1281–1290.
- Ribatti D, Mangialardi G, and Vacca A. (2006). Stephen Paget and the ‘seed and soil’ theory of metastatic dissemination. *Clin. Exp. Med.* **6**: 145–149.
- Rivers JK. (2004). Is there more than one road to melanoma? *The Lancet* **363**: 728–730.
- Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O’Day S, M D JW, Garbe C, *et al.* (2011). Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **364**: 2517–2526.
- Romerdahl CA, Stephens LC, Bucana C, and Kripke ML. (1989). The role of ultraviolet radiation in the induction of melanocytic skin tumors in inbred mice. *Cancer Commun.* **1**: 209–216.
- Rønnov-Jessen L, and Petersen OW. (1993). Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Lab. Invest.* **68**: 696–707.
- Rosen PJ, Sweeney CJ, Park DJ, Beaupre DM, Deng H, Leitch IM, *et al.* (2010). A phase Ib study of AMG 102 in combination with bevacizumab or motesanib in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* **16**: 2677–2687.
- Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, and Polakis P. (1997). Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* **275**: 1790–1792.
- Ruckäberle E. (2008). Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat* **112**: 41–52.
- Ruiter D, Bogenrieder T, Elder D, and Herlyn M. (2002). Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. *Lancet Oncol.* **3**: 35–43.
- Saad S, Gottlieb DJ, Bradstock KF, Overall CM, and Bendall LJ. (2002). Cancer cell-associated fibronectin induces release of matrix metalloproteinase-2 from normal fibroblasts. *Cancer Res.* **62**: 283–289.
- Saba JD, Nara F, Bielawska A, Garrett S, and Hannun YA. (1997). The BST1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is the sphingosine-1-phosphate lyase. *J. Biol. Chem.* **272**: 26087–26090.
- Sabbadini RA. (2006). Targeting sphingosine-1-phosphate for cancer therapy. *Br. J. Cancer* **95**: 1131–1135.
- Sabourdy F, Kedjouar B, Sorli SC, Colié S, Milhas D, Salma Y, *et al.* (2008). Functions of sphingolipid metabolism in mammals--lessons from genetic defects. *Biochim. Biophys. Acta* **1781**: 145–183.

- Sadahira Y, Ruan F, Hakomori S, and Igarashi Y. (1992). Sphingosine 1-phosphate, a specific endogenous signaling molecule controlling cell motility and tumor cell invasiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 9686–9690.
- Saddoughi SA, Song P, and Ogretmen B. (2008). Roles of bioactive sphingolipids in cancer biology and therapeutics. *Subcell. Biochem.* **49**: 413–440.
- Salven P, Heikkilä P, and Joensuu H. (1997). Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in metastatic melanoma. *Br. J. Cancer* **76**: 930–934.
- Samarasinghe V, and Madan V. (2012). Nonmelanoma skin cancer. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* **5**: 3.
- Sanchez T, Skoura A, Wu MT, Casserly B, Harrington EO, and Hla T. (2007). Induction of vascular permeability by the sphingosine-1-phosphate receptor-2 (S1P2R) and its downstream effectors ROCK and PTEN. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**: 1312–1318.
- Sankala HM, Hait NC, Paugh SW, Shida D, Lépine S, Elmore LW, *et al.* (2007). Involvement of sphingosine kinase 2 in p53-independent induction of p21 by the chemotherapeutic drug doxorubicin. *Cancer Res.* **67**: 10466–10474.
- Sanna MG, Wang S-K, Gonzalez-Cabrera PJ, Don A, Marsolais D, Matheu MP, *et al.* (2006). Enhancement of capillary leakage and restoration of lymphocyte egress by a chiral S1P1 antagonist in vivo. *Nat. Chem. Biol.* **2**: 434–441.
- Sato K, Malchinkhuu E, Horiuchi Y, Mogi C, Tomura H, Tosaka M, *et al.* (2007). Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes. *J. Neurochem.* **103**: 2610–2619.
- Satyamoorthy K, Li G, Vaidya B, Kalabis J, and Herlyn M. (2002). Insulin-like growth factor-I-induced migration of melanoma cells is mediated by interleukin-8 induction. *Cell Growth Differ.* **13**: 87–93.
- Satyamoorthy K, Li G, Vaidya B, Patel D, and Herlyn M. (2001). Insulin-like growth factor-1 induces survival and growth of biologically early melanoma cells through both the mitogen-activated protein kinase and beta-catenin pathways. *Cancer Res.* **61**: 7318–7324.
- Scarlatti F, Bauvy C, Ventruti A, Sala G, Cluzeaud F, Vandewalle A, *et al.* (2004). Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *J. Biol. Chem.* **279**: 18384–18391.
- Schmahl J, Raymond CS, and Soriano P. (2007). PDGF signaling specificity is mediated through multiple immediate early genes. *Nat. Genet* **39**: 52–60.
- Schnitzer SE, Weigert A, Zhou J, and Brüne B. (2009). Hypoxia enhances sphingosine kinase 2 activity and provokes sphingosine-1-phosphate-mediated chemoresistance in A549 lung cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **7**: 393–401.
- Schwab SR, and Cyster JG. (2007). Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat. Immunol.* **8**: 1295–1301.

- Schwab SR, Pereira JP, Matloubian M, Xu Y, Huang Y, and Cyster JG. (2005). Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science* **309**: 1735–1739.
- Schwalm S, Döll F, Römer I, Bubnova S, Pfeilschifter J, and Huwiler A. (2008). Sphingosine kinase-1 is a hypoxia-regulated gene that stimulates migration of human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **368**: 1020–1025.
- Schwartzentruber DJ, Lawson DH, Richards JM, Conry RM, Miller DM, Treisman J, *et al.* (2011). gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* **364**: 2119–2127.
- Scott AM, Wiseman G, Welt S, Adjei A, Lee F-T, Hopkins W, *et al.* (2003). A Phase I dose-escalation study of sibrotuzumab in patients with advanced or metastatic fibroblast activation protein-positive cancer. *Clin. Cancer Res.* **9**: 1639–1647.
- Sedlmaier A, Wernert N, Gallitzendörfer R, Abouzied MM, Gieselmann V, and Franken S. (2011). Overexpression of hepatoma-derived growth factor in melanocytes does not lead to oncogenic transformation. *BMC Cancer* **11**: 457.
- Ségui B, Andrieu-Abadie N, Jaffrézou J-P, Benoist H, and Levade T. (2006). Sphingolipids as modulators of cancer cell death: potential therapeutic targets. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**: 2104–2120.
- Sensken S-C, Stäubert C, Keul P, Levkau B, Schöneberg T, and Gräler MH. (2008). Selective activation of G alpha i mediated signalling of S1P3 by FTY720-phosphate. *Cell. Signal.* **20**: 1125–1133.
- Serra M, and Saba JD. (2010). Sphingosine 1-phosphate lyase, a key regulator of sphingosine 1-phosphate signaling and function. *Adv. Enzyme Regul.* **50**: 349–362.
- Shah M, Bhoumik A, Goel V, Dewing A, Breitwieser W, Kluger H, *et al.* (2010). A role for ATF2 in regulating MITF and melanoma development. *PLoS Genet.* **6**: e1001258.
- Sharpless NE, Kannan K, Xu J, Bosenberg MW, and Chin L. (2003). Both products of the mouse Ink4a/Arf locus suppress melanoma formation in vivo. *Oncogene* **22**: 5055–5059.
- Shida D, Takabe K, Kapitonov D, Milstien S, and Spiegel S. (2008). Targeting SphK1 as a new strategy against cancer. *Curr Drug Targets* **9**: 662–673.
- Shimizu H, Takahashi M, Kaneko T, Murakami T, Hakamata Y, Kudou S, *et al.* (2005). KRP-203, a novel synthetic immunosuppressant, prolongs graft survival and attenuates chronic rejection in rat skin and heart allografts. *Circulation* **111**: 222–229.
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, *et al.* (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 5522–5527.
- Silletti S, Kessler T, Goldberg J, Boger DL, and Cheresch DA. (2001). Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin alpha vbeta 3 by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 119–124.
- Singleton PA, Dudek SM, Ma S-F, and Garcia JGN. (2006). Transactivation of sphingosine 1-phosphate receptors is essential for vascular barrier regulation. Novel role for hyaluronan and CD44 receptor family. *J. Biol. Chem.* **281**: 34381–34393.

- Skoura A, and Hla T. (2009). Lysophospholipid receptors in vertebrate development, physiology, and pathology. *J. Lipid Res.* **50 Suppl**: S293–298.
- Smalley KSM, Lioni M, and Herlyn M. (2005). Targeting the stromal fibroblasts: a novel approach to melanoma therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* **5**: 1069–1078.
- Sobue S, Hagiwara K, Banno Y, Tamiya-Koizumi K, Suzuki M, Takagi A, *et al.* (2005). Transcription factor specificity protein 1 (Sp1) is the main regulator of nerve growth factor-induced sphingosine kinase 1 gene expression of the rat pheochromocytoma cell line, PC12. *J. Neurochem.* **95**: 940–949.
- Soengas MS, Capodici P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, *et al.* (2001). Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* **409**: 207–211.
- Soengas MS, and Lowe SW. (2003). Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* **22**: 3138–3151.
- Sotillo R, García JF, Ortega S, Martin J, Dubus P, Barbacid M, *et al.* (2001). Invasive melanoma in Cdk4-targeted mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 13312–13317.
- Sounni NE, Baramova EN, Munaut C, Maquoi E, Franken F, Foidart J-M, *et al.* (2002). Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in A2058 melanoma cells is associated with MMP-2 activation and increased tumor growth and vascularization. *Int. J. Cancer* **98**: 23–28.
- Soussi T, Kato S, Levy PP, and Ishioka C. (2005). Reassessment of the TP53 mutation database in human disease by data mining with a library of TP53 missense mutations. *Hum. Mutat.* **25**: 6–17.
- Spiegel S, and Milstien S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**: 397–407.
- Spiegel S, and Milstien S. (2000). Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. *FEBS Lett.* **476**: 55–57.
- Spiegel S, and Milstien S. (2011). The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **11**: 403–415.
- Stahelin RV, Hwang JH, Kim J-H, Park Z-Y, Johnson KR, Obeid LM, *et al.* (2005). The mechanism of membrane targeting of human sphingosine kinase 1. *J. Biol. Chem.* **280**: 43030–43038.
- Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, Bosenberg MW, *et al.* (2004). Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res.* **64**: 7002–7010.
- Stam JC, Michiels F, van der Kammen RA, Moolenaar WH, and Collard JG. (1998). Invasion of T-lymphoma cells: cooperation between Rho family GTPases and lysophospholipid receptor signaling. *EMBO J.* **17**: 4066–4074.
- Stoffel W, LeKim D, and Sticht G. (1969). Distribution and properties of dihydrosphingosine-1-phosphate aldolase (sphinganine-1-phosphate alkanal-lyase). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **350**: 1233–1241.

- Strickland FM, Muller HK, Stephens LC, Bucana CD, Donawho CK, Sun Y, *et al.* (2000). Induction of primary cutaneous melanomas in C3H mice by combined treatment with ultraviolet radiation, ethanol and aloe emodin. *Photochem. Photobiol.* **72**: 407–414.
- Strub GM, Maceyka M, Hait NC, Milstien S, and Spiegel S. (2010). Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Adv. Exp. Med. Biol.* **688**: 141–155.
- Strub GM, Paillard M, Liang J, Gomez L, Allegood JC, Hait NC, *et al.* (2011). Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 in mitochondria interacts with prohibitin 2 to regulate complex IV assembly and respiration. *FASEB J.* **25**: 600–612.
- Le Stunff H, Galve-Roperh I, Peterson C, Milstien S, and Spiegel S. (2002). Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis. *J. Cell Biol.* **158**: 1039–1049.
- Le Stunff H, Giussani P, Maceyka M, Lépine S, Milstien S, and Spiegel S. (2007). Recycling of sphingosine is regulated by the concerted actions of sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase 1 and sphingosine kinase 2. *J. Biol. Chem.* **282**: 34372–34380.
- Sugawara T, Kinoshita M, Ohnishi M, Tsuzuki T, Miyazawa T, Nagata J, *et al.* (2004). Efflux of sphingoid bases by P-glycoprotein in human intestinal Caco-2 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**: 2541–2546.
- Sun H-Y, Wei S-P, Xu R-C, Xu P-X, and Zhang W-C. (2010). Sphingosine-1-phosphate induces human endothelial VEGF and MMP-2 production via transcription factor ZNF580: novel insights into angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **395**: 361–366.
- Sutherland CM, Moretti PAB, Hewitt NM, Bagley CJ, Vadas MA, and Pitson SM. (2006). The calmodulin-binding site of sphingosine kinase and its role in agonist-dependent translocation of sphingosine kinase 1 to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **281**: 11693–11701.
- Taha TA, Kitatani K, El-Alwani M, Bielawski J, Hannun YA, and Obeid LM. (2006). Loss of sphingosine kinase-1 activates the intrinsic pathway of programmed cell death: modulation of sphingolipid levels and the induction of apoptosis. *FASEB J.* **20**: 482–484.
- Takabe K, Paugh SW, Milstien S, and Spiegel S. (2008). ‘Inside-out’ signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol. Rev* **60**: 181–195.
- Takahashi K, Eto H, and Tanabe KK. (1999). Involvement of CD44 in matrix metalloproteinase-2 regulation in human melanoma cells. *Int. J. Cancer* **80**: 387–395.
- Takasugi N, Sasaki T, Suzuki K, Osawa S, Isshiki H, Hori Y, *et al.* (2011). BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate. *J. Neurosci.* **31**: 6850–6857.
- Takizawa H, Sato S, Kitajima H, Konishi S, Iwata K, and Hayashi Y. (1985). Mouse skin melanoma induced in two stage chemical carcinogenesis with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and croton oil. *Carcinogenesis* **6**: 921–923.
- Takuwa N, Du W, Kaneko E, Okamoto Y, Yoshioka K, and Takuwa Y. (2011). Tumor-suppressive sphingosine-1-phosphate receptor-2 counteracting tumor-promoting sphingosine-1-phosphate receptor-1 and sphingosine kinase 1 - Jekyll Hidden behind Hyde. *Am J Cancer Res* **1**: 460–481.

- Takuwa N, Ohkura S-I, Takashima S-I, Ohtani K, Okamoto Y, Tanaka T, *et al.* (2010). S1P3-mediated cardiac fibrosis in sphingosine kinase 1 transgenic mice involves reactive oxygen species. *Cardiovasc. Res.* **85**: 484–493.
- Tang L, Tron VA, Reed JC, Mah KJ, Krajewska M, Li G, *et al.* (1998). Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma. *Clin. Cancer Res.* **4**: 1865–1871.
- Terai K, Soga T, Takahashi M, Kamohara M, Ohno K, Yatsugi S, *et al.* (2003). Edg-8 receptors are preferentially expressed in oligodendrocyte lineage cells of the rat CNS. *Neuroscience* **116**: 1053–1062.
- Thang ND, Yajima I, Nakagawa K, Tsuzuki T, Kumasaka MY, Ohgami N, *et al.* (2012). A novel hairless mouse model for malignant melanoma. *J. Dermatol. Sci.* **65**: 207–212.
- Tormo D, Ferrer A, Gaffal E, Wenzel J, Basner-Tschakarjan E, Steitz J, *et al.* (2006). Rapid growth of invasive metastatic melanoma in carcinogen-treated hepatocyte growth factor/scatter factor-transgenic mice carrying an oncogenic CDK4 mutation. *Am. J. Pathol.* **169**: 665–672.
- Tran MA, Smith CD, Kester M, and Robertson GP. (2008). Combining nanoliposomal ceramide with sorafenib synergistically inhibits melanoma and breast cancer cell survival to decrease tumor development. *Clin. Cancer Res.* **14**: 3571–3581.
- Trimboli AJ, Cantemir-Stone CZ, Li F, Wallace JA, Merchant A, Creasap N, *et al.* (2009). Pten in stromal fibroblasts suppresses mammary epithelial tumours. *Nature* **461**: 1084–1091.
- Tsao H, Atkins MB, and Sober AJ. (2004).(a). Management of cutaneous melanoma. *N. Engl. J. Med.* **351**: 998–1012.
- Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, and Haluska FG. (2004).(b). Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **122**: 337–341.
- Tsao H, Zhang X, Fowlkes K, and Haluska FG. (2000). Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines. *Cancer Res.* **60**: 1800–1804.
- Tsegaye Y, Richardson CG, Bravo JE, Mulcahy BJ, Lynch DV, Markham JE, *et al.* (2007). Arabidopsis mutants lacking long chain base phosphate lyase are fumonisin-sensitive and accumulate trihydroxy-18:1 long chain base phosphate. *J. Biol. Chem.* **282**: 28195–28206.
- Tu G, Xu W, Huang H, and Li S. (2008). Progress in the development of matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **15**: 1388–1395.
- Tuhkanen H, Anttila M, Kosma V-M, Ylä-Herttua S, Heinonen S, Kuronen A, *et al.* (2004). Genetic alterations in the peritumoral stromal cells of malignant and borderline epithelial ovarian tumors as indicated by allelic imbalance on chromosome 3p. *Int. J. Cancer* **109**: 247–252.
- Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Dang TD, Ayala GE, and Rowley DR. (2002). Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. *Cancer Res.* **62**: 3298–3307.
- Ulisse S, Baldini E, Sorrenti S, and D’Armiento M. (2009). The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* **9**: 32–71.

- Uong A, and Zon LI. (2010). Melanocytes in development and cancer. *J. Cell. Physiol.* **222**: 38–41.
- Upadhyaya P, Kumar A, Byun H-S, Bittman R, Saba JD, and Hecht SS. (2012). The sphingolipid degradation product trans-2-hexadecenal forms adducts with DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **424**: 18–21.
- Urata Y, Nishimura Y, Hirase T, and Yokoyama M. (2005). Sphingosine 1-phosphate induces alpha-smooth muscle actin expression in lung fibroblasts via Rho-kinase. *Kobe J Med Sci* **51**: 17–27.
- Urtz N, Olivera A, Bofill-Cardona E, Csonga R, Billich A, Mechtcheriakova D, *et al.* (2004). Early activation of sphingosine kinase in mast cells and recruitment to FcepsilonRI are mediated by its interaction with Lyn kinase. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 8765–8777.
- Vadas M, Xia P, McCaughan G, and Gamble J. (2008). The role of sphingosine kinase 1 in cancer: oncogene or non-oncogene addiction? *Biochim. Biophys. Acta* **1781**: 442–447.
- Väisänen A, Tuominen H, Kallioinen M, and Turpeenniemi-Hujanen T. (1996). Matrix metalloproteinase-2 (72 kD type IV collagenase) expression occurs in the early stage of human melanocytic tumour progression and may have prognostic value. *J. Pathol.* **180**: 283–289.
- Valyi-Nagy IT, Hirka G, Jensen PJ, Shih IM, Juhasz I, and Herlyn M. (1993). Undifferentiated keratinocytes control growth, morphology, and antigen expression of normal melanocytes through cell-cell contact. *Lab. Invest.* **69**: 152–159.
- VanBrocklin MW, Robinson JP, Lastwika KJ, Khoury JD, and Holmen SL. (2010). Targeted delivery of NRASQ61R and Cre-recombinase to post-natal melanocytes induces melanoma in Ink4a/Arflox/lox mice. *Pigment Cell & Melanoma Research* **23**: 531–541.
- Vasseur S, Hoffmeister A, Garcia S, Bagnis C, Dagorn J-C, and Iovanna JL. (2002). p8 is critical for tumour development induced by rasV12 mutated protein and E1A oncogene. *EMBO Rep.* **3**: 165–170.
- Van Veldhoven PP, Gijsbers S, Mannaerts GP, Vermeesch JR, and Brys V. (2000). Human sphingosine-1-phosphate lyase: cDNA cloning, functional expression studies and mapping to chromosome 10q22(1). *Biochim. Biophys. Acta* **1487**: 128–134.
- van Veldhoven PP, and Mannaerts GP. (1993). Sphingosine-phosphate lyase. *Adv. Lipid Res.* **26**: 69–98.
- Venkataraman K, Lee Y-M, Michaud J, Thangada S, Ai Y, Bonkovsky HL, *et al.* (2008). Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circ. Res.* **102**: 669–676.
- Venkataraman K, Thangada S, Michaud J, Oo ML, Ai Y, Lee Y-M, *et al.* (2006). Extracellular export of sphingosine kinase-1a contributes to the vascular S1P gradient. *Biochem. J.* **397**: 461–471.
- Vessey DA, Li L, Honbo N, and Karliner JS. (2009). Sphingosine 1-phosphate is an important endogenous cardioprotectant released by ischemic pre- and postconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **297**: H1429–1435.
- Villanueva J, and Herlyn M. (2008). Melanoma and the tumor microenvironment. *Curr Oncol Rep* **10**: 439–446.

- Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, Cavalli AL, Moreno KM, Matteo RG, *et al.* (2006). Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell* **9**: 225–238.
- Wallace A, Kapoor V, Sun J, Mrass P, Weninger W, Heitjan DF, *et al.* (2008). Transforming growth factor-beta receptor blockade augments the effectiveness of adoptive T-cell therapy of established solid cancers. *Clin. Cancer Res.* **14**: 3966–3974.
- Walzer T, Chiossone L, Chaix J, Calver A, Carozzo C, Garrigue-Antar L, *et al.* (2007). Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nat. Immunol.* **8**: 1337–1344.
- Wamhoff BR, Lynch KR, Macdonald TL, and Owens GK. (2008). Sphingosine-1-phosphate receptor subtypes differentially regulate smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**: 1454–1461.
- Wang F, Van Brocklyn JR, Edsall L, Nava VE, and Spiegel S. (1999). Sphingosine-1-phosphate inhibits motility of human breast cancer cells independently of cell surface receptors. *Cancer Res.* **59**: 6185–6191.
- Wang W, Graeler MH, and Goetzl EJ. (2005). Type 4 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor (S1P4) transduces S1P effects on T cell proliferation and cytokine secretion without signaling migration. *FASEB J.* **19**: 1731–1733.
- Watt AJ, Kotsis SV, and Chung KC. (2004). Risk of melanoma arising in large congenital melanocytic nevi: a systematic review. *Plast. Reconstr. Surg.* **113**: 1968–1974.
- Wattenberg BW. (2010). Role of sphingosine kinase localization in sphingolipid signaling. *World J Biol Chem* **1**: 362–368.
- Weigert A, Cremer S, Schmidt MV, von Knethen A, Angioni C, Geisslinger G, *et al.* (2010). Cleavage of sphingosine kinase 2 by caspase-1 provokes its release from apoptotic cells. *Blood* **115**: 3531–3540.
- Weigert A, Johann AM, von Knethen A, Schmidt H, Geisslinger G, and Brüne B. (2006). Apoptotic cells promote macrophage survival by releasing the antiapoptotic mediator sphingosine-1-phosphate. *Blood* **108**: 1635–1642.
- Weigert A, Schiffmann S, Sekar D, Ley S, Menrad H, Werno C, *et al.* (2009). Sphingosine kinase 2 deficient tumor xenografts show impaired growth and fail to polarize macrophages towards an anti-inflammatory phenotype. *Int. J. Cancer* **125**: 2114–2121.
- Wellbrock C, Ogilvie L, Hedley D, Karasarides M, Martin J, Niculescu-Duvaz D, *et al.* (2004). V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Res.* **64**: 2338–2342.
- Westermarck J, and Kähäri VM. (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* **13**: 781–792.
- White RM, and Zon LI. (2008). Melanocytes in development, regeneration, and cancer. *Cell Stem Cell* **3**: 242–252.
- Whitwam T, Vanbrocklin MW, Russo ME, Haak PT, Bilgili D, Resau JH, *et al.* (2007). Differential oncogenic potential of activated RAS isoforms in melanocytes. *Oncogene* **26**: 4563–4570.



- Widlund HR, Horstmann MA, Price ER, Cui J, Lessnick SL, Wu M, *et al.* (2002). Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. *J. Cell Biol.* **158**: 1079–1087.
- Willmore-Payne C, Holden JA, Tripp S, and Layfield LJ. (2005). Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. *Hum. Pathol.* **36**: 486–493.
- Witkiewicz AK, Dasgupta A, Sotgia F, Mercier I, Pestell RG, Sabel M, *et al.* (2009). An absence of stromal caveolin-1 expression predicts early tumor recurrence and poor clinical outcome in human breast cancers. *Am. J. Pathol.* **174**: 2023–2034.
- Woods SL, and Bishop JM. (2011). A new transgenic mouse line for tetracycline inducible transgene expression in mature melanocytes and the melanocyte stem cells using the Dopachrome tautomerase promoter. *Transgenic Res.* **20**: 421–428.
- Xia P, Gamble JR, Rye KA, Wang L, Hii CS, Cockerill P, *et al.* (1998). Tumor necrosis factor-alpha induces adhesion molecule expression through the sphingosine kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 14196–14201.
- Xia P, Gamble JR, Wang L, Pitson SM, Moretti PA, Wattenberg BW, *et al.* (2000). An oncogenic role of sphingosine kinase. *Curr. Biol.* **10**: 1527–1530.
- Xia P, and Wadham C. (2011). Sphingosine 1-phosphate, a key mediator of the cytokine network: juxtacrine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* **22**: 45–53.
- Xia P, Wang L, Moretti PAB, Albanese N, Chai F, Pitson SM, *et al.* (2002). Sphingosine kinase interacts with TRAF2 and dissects tumor necrosis factor-alpha signaling. *J. Biol. Chem.* **277**: 7996–8003.
- Xin C, Ren S, Kleuser B, Shabahang S, Eberhardt W, Radeke H, *et al.* (2004). Sphingosine 1-phosphate cross-activates the Smad signaling cascade and mimics transforming growth factor-beta-induced cell responses. *J. Biol. Chem.* **279**: 35255–35262.
- Yamaguchi H, Kitayama J, Takuwa N, Arikawa K, Inoki I, Takehara K, *et al.* (2003). Sphingosine-1-phosphate receptor subtype-specific positive and negative regulation of Rac and haematogenous metastasis of melanoma cells. *Biochem. J.* **374**: 715–722.
- Yamamura K, Kamada S, Ito S, Nakagawa K, Ichihashi M, and Tsujimoto Y. (1996). Accelerated disappearance of melanocytes in bcl-2-deficient mice. *Cancer Res.* **56**: 3546–3550.
- Yamanaka M, Shegogue D, Pei H, Bu S, Bielawska A, Bielawski J, *et al.* (2004). Sphingosine kinase 1 (SPHK1) is induced by transforming growth factor-beta and mediates TIMP-1 up-regulation. *J. Biol. Chem.* **279**: 53994–54001.
- Yamanashi T, Nakanishi Y, Fujii G, Akishima-Fukasawa Y, Moriya Y, Kanai Y, *et al.* (2009). Podoplanin expression identified in stromal fibroblasts as a favorable prognostic marker in patients with colorectal carcinoma. *Oncology* **77**: 53–62.
- Yamashita H, Kitayama J, Shida D, Yamaguchi H, Mori K, Osada M, *et al.* (2006). Sphingosine 1-phosphate receptor expression profile in human gastric cancer cells: differential regulation on the migration and proliferation. *J. Surg. Res.* **130**: 80–87.

- Yamazaki F, Okamoto H, Matsumura Y, Tanaka K, Kunisada T, and Horio T. (2005). Development of a new mouse model (xeroderma pigmentosum a-deficient, stem cell factor-transgenic) of ultraviolet B-induced melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **125**: 521–525.
- Yang G, Curley D, Bosenberg MW, and Tsao H. (2007). Loss of xeroderma pigmentosum C (Xpc) enhances melanoma photocarcinogenesis in Ink4a-Arf-deficient mice. *Cancer Res.* **67**: 5649–5657.
- Yang J, Luan J, Yu Y, Li C, DePinho RA, Chin L, *et al.* (2001). Induction of melanoma in murine macrophage inflammatory protein 2 transgenic mice heterozygous for inhibitor of kinase/alternate reading frame. *Cancer Res.* **61**: 8150–8157.
- Yang J, Splittgerber R, Yull FE, Kantrow S, Ayers GD, Karin M, *et al.* (2010). Conditional ablation of Ikkb inhibits melanoma tumor development in mice. *J. Clin. Invest.* **120**: 2563–2574.
- Yatomi Y, Yamamura S, Ruan F, and Igarashi Y. (1997). Sphingosine 1-phosphate induces platelet activation through an extracellular action and shares a platelet surface receptor with lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **272**: 5291–5297.
- Yazdi AS, Palmedo G, Flaig MJ, Puchta U, Reckwerth A, Rütten A, *et al.* (2003). Mutations of the BRAF gene in benign and malignant melanocytic lesions. *J. Invest. Dermatol.* **121**: 1160–1162.
- Yester JW, Tizazu E, Harikumar KB, and Kordula T. (2011). Extracellular and intracellular sphingosine-1-phosphate in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **30**: 577–597.
- Yonesu K, Kawase Y, Inoue T, Takagi N, Tsuchida J, Takuwa Y, *et al.* (2009). Involvement of sphingosine-1-phosphate and S1P1 in angiogenesis: analyses using a new S1P1 antagonist of non-sphingosine-1-phosphate analog. *Biochem. Pharmacol.* **77**: 1011–1020.
- Yonesu K, Nakamura T, Mizuno Y, Suzuki C, Nagayama T, Satoh S, *et al.* (2010). A novel sphingosine-1-phosphate receptor 1 antagonist prevents the proliferation and relaxation of vascular endothelial cells by sphingosine-1-phosphate. *Biol. Pharm. Bull.* **33**: 1500–1505.
- Yoon CM, Hong BS, Moon HG, Lim S, Suh P-G, Kim Y-K, *et al.* (2008). Sphingosine-1-phosphate promotes lymphangiogenesis by stimulating S1P1/Gi/PLC/Ca<sup>2+</sup> signaling pathways. *Blood* **112**: 1129–1138.
- Yoshida Y. (2010).(a). Sphingosine-1-phosphate receptor type 1 regulates glioma cell proliferation and correlates with patient survival. *Int. J. Cancer.* **126**: 2341–2352.
- Yoshida Y. (2010).(b). The expression level of sphingosine-1-phosphate receptor type 1 is related to MIB-1 labeling index and predicts survival of glioblastoma patients. *J. Neurooncol.* **98**: 41–47.
- Young KW, Willets JM, Parkinson MJ, Bartlett P, Spiegel S, Nahorski SR, *et al.* (2003). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent translocation of sphingosine kinase: role in plasma membrane relocation but not activation. *Cell Calcium* **33**: 119–128.
- Young N, Pearl DK, and Van Brocklyn JR. (2009). Sphingosine-1-phosphate regulates glioblastoma cell invasiveness through the urokinase plasminogen activator system and CCN1/Cyr61. *Mol. Cancer Res.* **7**: 23–32.

- Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, and Kalluri R. (2007). Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* **67**: 10123–10128.
- Zemann B, Kinzel B, Müller M, Reuschel R, Mechtcheriakova D, Urtz N, *et al.* (2006). Sphingosine kinase type 2 is essential for lymphopenia induced by the immunomodulatory drug FTY720. *Blood* **107**: 1454–1458.
- Zhan X, and Desiderio DM. (2006). Nitroproteins from a human pituitary adenoma tissue discovered with a nitrotyrosine affinity column and tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **354**: 279–289.
- Zhang H, Desai NN, Olivera A, Seki T, Brooker G, and Spiegel S. (1991). Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J. Cell Biol.* **114**: 155–167.
- Zhang K, Pompey JM, Hsu F-F, Key P, Bandhuvula P, Saba JD, *et al.* (2007). Redirection of sphingolipid metabolism toward de novo synthesis of ethanolamine in Leishmania. *EMBO J.* **26**: 1094–1104.
- Zhou J, and Saba JD. (1998). Identification of the first mammalian sphingosine phosphate lyase gene and its functional expression in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**: 502–507.
- Zhou Y, Lekic T, Fathali N, Ostrowski RP, Martin RD, Tang J, *et al.* (2010). Isoflurane posttreatment reduces neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats by the sphingosine-1-phosphate/phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway. *Stroke* **41**: 1521–1527.
- Zhu H, Reuhl K, Zhang X, Botha R, Ryan K, Wei J, *et al.* (1998). Development of heritable melanoma in transgenic mice. *J. Invest. Dermatol.* **110**: 247–252.

## RESUME EN FRANÇAIS

Le mélanome métastatique demeure un cancer au sombre pronostic, et aucune des thérapies conventionnelles n'a pu apporter de bénéfice sur la survie globale. Malgré les nombreux progrès réalisés dans la compréhension de la biologie et la génétique du mélanome, peu de traitements efficaces sont actuellement disponibles. De plus en plus de preuves renforcent la notion que le microenvironnement tumoral jouerait un rôle clé dans la progression de ces tumeurs. Les cellules cancéreuses interagissent de façon dynamique et bidirectionnelle avec le stroma à travers des échanges moléculaires modulant le phénotype tumoral. L'objectif de ces travaux de thèse a été de définir le rôle de la sphingosine 1-phosphate (S1P) dans les interactions mélanome-stroma. La signalisation "inside-out" de la S1P lui permet d'agir à la fois sur les cellules tumorales et sur les cellules stromales et souligne l'intérêt de ce métabolite bioactif pour la thérapie ciblée des mélanomes de stade avancé. L'analyse de l'expression des enzymes du métabolisme de la S1P dans des lignées cellulaires de mélanome humain a mis en évidence des altérations en faveur de l'accumulation de S1P dans les cellules malignes en comparaison avec des mélanocytes sains. Cette observation a été confirmée *in situ* dans des tissus tumoraux issus de patients atteints de mélanome. La prolifération et la migration des cellules de mélanome ne sont pas affectées par des modifications d'expression des enzymes du métabolisme de la S1P, mais peuvent être modulées par l'addition de S1P exogène. Ainsi, des fibroblastes dermiques qui sécrètent de la S1P influencent la migration des cellules de mélanome en co-culture. De plus, l'incubation de ces fibroblastes avec du milieu conditionné issu de cellules de mélanome induit l'expression de protéines impliquées dans la différenciation myofibroblastique ainsi que celle de la sphingosine kinase 1 (SK1) par les fibroblastes. Des expériences de tumorigenèse *in vivo* ont permis de montrer que la croissance tumorale locale et les métastases étaient augmentées de façon plus efficace par la co-injection de fibroblastes cutanés sauvages par rapport à des fibroblastes issus de souris *Sphk1*<sup>-/-</sup>. Enfin, tandis que la diminution des taux de S1P plasmatique chez les souris *Sphk1*<sup>-/-</sup> est associée à une inhibition de la croissance et de la dissémination des cellules de mélanome, cette dernière est à l'inverse potentialisée chez les souris *Sphk2*<sup>-/-</sup> qui présentent des taux de S1P plasmatique élevés.

L'ensemble de nos résultats démontre l'implication de la S1P dans les interactions entre le mélanome et son microenvironnement, soulignant l'intérêt de cibler ce sphingolipide bioactif en thérapeutique.