



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :
Guillaume ANDRIEU

le 7 Février 2014

Titre :

Rôle de la voie sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate dans le contrôle de la division cellulaire

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Biotechnologies, Cancérologie

Unité de recherche :

Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale — CNRS UMR 5089

Directeur(s) de Thèse :

Pr. Anastassia HATZOGLOU & Dr. Olivier CUVILLIER

Jury :

Pr. Bernard DUCOMMUN, Président

Dr. Ariane ABRIEU, Rapportrice

Dr. François PARIS, Rapporteur

Dr. Thierry LORCA, Examineur

Pr. Anastassia HATZOGLOU, Directrice de thèse

Dr. Olivier CUVILLIER, Directeur de thèse

Je dédie ce manuscrit à ma famille ainsi qu'à Cécile, Delphine & Anastassia Hatzoglou.

« Que de fois il arrive qu'en croyant expérimenter sur autrui nous expérimentons en réalité sur nous-mêmes ! »

Oscar Wilde, *Le Portrait de Dorian Gray*

Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury, mes rapporteurs Madame le Docteur Ariane Abrieu et Monsieur le Docteur François Paris, mon examinateur Monsieur le Docteur Thierry Lorca. Je suis très honoré de l'intérêt que vous avez accordé à mon travail ainsi que d'avoir accepté de l'évaluer. Je remercie vivement le Professeur Bernard Ducommun qui a accepté de présider ce jury. Merci pour votre contribution et votre implication depuis mes stages de master au sein de votre laboratoire.

Anastassia, je tiens à te remercier très chaleureusement pour tout ce que tu as fait pour moi depuis les rangs de la fac, dès ce stage de licence qui m'a permis de découvrir le métier de chercheur, jusqu'à mon doctorat. Je suis très touché de la confiance que tu m'as témoigné et heureux d'avoir choisi, il y a trois ans et demi, de te suivre dans cette aventure. Sous ta direction, j'ai énormément appris, autant sur le plan scientifique qu'humain, et je suis très fier d'avoir été ton étudiant pendant toutes ces années. Je suis persuadé que j'aurai été très différent aujourd'hui si je n'étais pas passé sous ta houlette et ta protection. Ta pédagogie, ton exigence, ta rigueur et ta passion m'ont notamment beaucoup aidé tout au long de ces six ans.

Olivier, je vous remercie profondément pour m'avoir accueilli dans votre équipe, votre confiance, et pour avoir accepté de co-diriger ma thèse. Votre vision scientifique et votre sens critique ont notamment permis d'aboutir à ce résultat personnel et je vous suis très reconnaissant. Je suis fier d'avoir réalisé ce travail dans votre équipe.

Un grand merci également à Isabelle Ader et à Leyre Brizuela-Madrid qui ont toujours été là pour moi et grâce à qui j'ai beaucoup appris. Merci pour votre présence, nos échanges, votre implication, votre bonne humeur qui font de cette équipe un cadre si attachant.

L'équipe « Sphingolipides et Cancer » est une petite famille dans laquelle règne une ambiance géniale et très conviviale, propice à l'épanouissement. J'ai également eu la grande chance d'y rencontrer deux personnes qui me sont très chères. Cécile, PharmD, nearly double-Doctor, alias Natacha, et Pierre, alias le Maître, je vous remercie du fond du cœur pour votre amitié, votre présence à mes côtés, pour toutes les choses qu'on a vécues et découvertes ensemble, et toutes celles qui nous attendent. Vous êtes des amis chers. On a quasiment fait les 400 coups ensemble, plusieurs fois même, et traversé le globe ! Vous êtes deux piliers essentiels, vous avez été là à des moments importants de ma vie et je vous en remercie.

Je remercie aussi les autres membres de notre équipe. Adeline, à qui je souhaite la bienvenue, Magalie, Claire, Marie-Lise Maddelein, et Bernard Malavaud. Je vous souhaite de réussir dans vos

projets et de vivre ici tout ce que j'ai eu la chance de connaître. Je remercie aussi les anciens étudiants Johnny, Matthieu, Quentin, Lucie, Pierre, Lauriane, Thomas, Elisabeth...

Au-delà de l'équipe, j'ai également eu la chance de rencontrer une autre personne formidable. Delphine, je te remercie très chaleureusement pour tout ce que tu fais pour moi et ce que tu représentes. Comme Cécile et Pierre, tu fais partie de ce « noyau dur », tu as été là pour moi à des moments très importants de ma vie. Et tu as ce truc en plus. Je suis très heureux et fier de te connaître, tu m'es très chère.

Je remercie fortement également le groupe d'amis forgé pendant ma thèse avec en tête Romain Bobby Britney, Pauline et Relo-Hime-Sama. Nous avons encore plein de choses à vivre et à découvrir ensemble.

Je remercie du fond du cœur Emilie avec qui j'ai eu le plaisir de partager des bancs à la fac, des paillasses au LBCMCP et beaucoup de bons moments.

Un grand merci également à la fine équipe des TP Seminars avec une mention spéciale pour Lise, Nathalie, Fanny, Boštjan, Elisabeth qu'on compte parmi nous. Merci aux filles d'à-côté Amandine, Christine, Lara, Sophie. Merci les MICA Victor, Adrien et Ikrame. Un salut à Michel et Hepsie.

J'adresse une pensée particulière à Camille et la remercie pour tout ce qu'elle m'a apporté au cours de ces années, ainsi que pour nos longues discussions à propos de cycle, de chimiorésistance, de Mad2 et BubR1.

Je remercie Camille et Ludivine pour leur accueil à mes débuts à l'IPBS et leur convivialité.

Je tiens à remercier mes amis de longue date Loïc, Corentin, Alex, Igor qui ont suivi l'avancée de ma thèse et qui m'ont été d'un soutien précieux.

Pour terminer, je tiens à remercier du fond du cœur toute ma famille qui m'a encouragé, soutenu, m'a donné le goût des sciences, et qui a toujours été là pour moi.

Table des matières

REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	7
RESUME DES TRAVAUX DE THESE	13
ABSTRACT	14
LISTE DES ABREVIATIONS	15
INTRODUCTION GENERALE	19
CHAPITRE 1. LA DIVISION CELLULAIRE OU MITOSE	21
1. INTRODUCTION AU CYCLE CELLULAIRE	21
1.1. DE LA CELLULE AU CYCLE CELLULAIRE	21
1.2. L'INTERPHASE	23
1.2.1. La phase G1	23
1.2.2. La phase S	23
1.2.3. La phase G2	24
1.3. LA MITOSE, PHASE DE DIVISION CELLULAIRE	24
1.3.1. La prophase	24
1.3.2. La prométaphase	25
1.3.2.1. Le fuseau mitotique	25
1.3.2.2. Capture et alignement des chromosomes	27
1.3.3. La métaphase	27
1.3.4. L'anaphase	27
1.3.5. La télophase	27
1.3.6. La cytokinèse	28
2. REGULATION DE LA PROGRESSION DANS LE CYCLE CELLULAIRE	28
2.1. LES COMPLEXES CDK/CYCLINE	28
2.1.1. Les Cdks et les cyclines	28
2.1.2. Régulation des complexes Cdk/cycline	28
2.1.3. Régulation du cycle cellulaire par les complexes Cdk/cycline	29
2.2. LES PHOSPHATASES REGULATRICES DU CYCLE CELLULAIRE	31

2.2.1. Les phosphatases Cdc25	31
2.2.2. La famille des protéine phosphatases	31
2.3. LES POINTS DE CONTROLE DU CYCLE CELLULAIRE	32
3. LE SPINDLE ASSEMBLY CHECKPOINT	33
3.1. BASES MOLECULAIRES DU FONCTIONNEMENT DU SAC	35
3.1.1. Identification des principales protéines du SAC	35
3.1.2. Le kinétochore, plateforme du SAC	37
3.1.3. Activation du SAC	38
3.1.4. Régulation de l'interaction microtubules-kinétochore	40
3.1.4.1. Le réseau KMN et l'interaction avec les microtubules	40
3.1.4.2. Stabilisation de l'attachement des microtubules, une histoire sous haute tension ?	40
3.1.5. Inactivation du SAC	43
4. RELATION ENTRE LE SAC ET LE CANCER	45
4.1. LE SAC PREVIENT LA GENERATION D'ANEUPLOÏDIE	45
4.2. CIBLAGE DU SAC DANS LA CHIMIOTHERAPIE ANTI-CANCER	46
CHAPITRE 2. LA VOIE SPHINGOSINE KINASE/SPHINGOSINE 1-PHOSPHATE	49
1. GENERALITES SUR LE METABOLISME SPHINGOLIPIDIQUE	49
1.1. BASES STRUCTURALES DES SPHINGOLIPIDES	49
1.2. LE METABOLISME SPHINGOLIPIDIQUE	49
1.2.1. La synthèse <i>de novo</i>	50
1.2.2. Autres voies de production du céramide et dérivés	50
1.2.2.1. Les sphingomyélines	51
1.2.2.2. Les glycosphingolipides	51
1.2.2.3. Le céramide 1-phosphate	52
1.2.2.4. La sphingosine et la sphingosine 1-phosphate, vers la sortie du métabolisme sphingolipidique	52
1.2.3. Notions de « lipide bioactif » et de biostat céramide/S1P	53
2. LES SPHINGOSINE KINASES	54
2.1. PROPRIETES STRUCTURALES	54
2.1.1. Variants d'épissage de la SphK1	54
2.1.2. Variants d'épissage de la SphK2	55
2.1.3. Cinq domaines fonctionnels hautement conservés au cours de l'évolution	55
2.1.4. Autres séquences remarquables	56

2.1.4.1. La SphK1	56
2.1.4.2. La SphK2	59
2.2. PROPRIETES BIOCHIMIQUES	60
2.2.1. La SphK1	60
2.2.2. La SphK2	60
2.3. PROPRIETES BIOLOGIQUES	60
2.4. REGULATION DES SPHKs	62
2.4.1. Activation	62
2.4.1.1. La SphK1	62
2.4.1.2. La SphK2	63
2.4.2. Localisation subcellulaire	64
2.4.2.1. La SphK1	64
2.4.2.2. La SphK2	65
2.4.2.3. Les SphKs extracellulaires	66
3. LA VOIE SPHKs/S1P	66
3.1. LA S1P, FACTEUR PARACRINE ET LIGAND DE RECEPTEURS TRANSMEMBRANAIRES	67
3.1.1. Le S1P ₁	68
3.1.2. Le S1P ₂	68
3.1.3. Le S1P ₃	69
3.1.4. Le S1P ₄	69
3.1.5. Le S1P ₅	69
3.2. LA S1P, MESSENGER INTRACELLULAIRE ET SES CIBLES	70
3.2.1. La S1P, régulateur des HDAC1/2	71
3.2.2. La S1P, cofacteur de l'E3 ligase TRAF2	71
3.2.3. La S1P et la prohibitine 2	71
3.2.4. La S1P et la BACE1	71
3.3. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA VOIE SPHKs/S1P	72
3.3.1. Cancer	72
3.3.1.1. Implication de la voie SphKs/S1P dans le développement et la progression tumorale	72
3.3.1.2. Implications de la voie SphKs/S1P dans la résistance thérapeutique du cancer	77
3.3.1.3. Ciblage de la voie SphKs/S1P dans les stratégies thérapeutiques anti-tumorales	78
3.3.2. Inflammation et immunité	82
3.3.3. Système cardiovasculaire et athérosclérose	84
3.3.4. Diabète et obésité	85

PROBLEMATIQUE	87
RESULTATS EXPERIMENTAUX	89
MATERIELS ET METHODES	91
1. LIGNEES ET CULTURE CELLULAIRE	91
2. REACTIFS	91
3. ANTICORPS	92
4. SYNCHRONISATION DES CELLULES	92
5. TRANSFECTION D'ARN INTERFERENT	93
6. PLASMIDES ET TRANSFECTION D'ADN PLASMIDIQUE	93
7. WESTERN BLOT	94
8. IMMUNOCYTOCHIMIE	95
9. MICROSCOPIE CONFOCALE ET VIDEOMICROSCOPIE	95
10. DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE SPHINGOSINE KINASE	96
11. RT-PCR QUANTITATIVE	98
12. CYTOMETRIE DE FLUX	99
13. ANALYSE STATISTIQUE	100
RESULTATS	101
1. LOCALISATION INTRACELLULAIRE DES SPHKs EN MITOSE	101
2. LA SUREXPRESSION DES SPHKs REDUIT LA DUREE DE LA PROMETAPHASE	101
3. LA DEPLETION DES SPHKs PROLONGE LA DUREE DE LA PROMETAPHASE	108
4. L'INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DE LA SPHK1 PROLONGE LA DUREE DE LA PROMETAPHASE	110
5. LES SPHKs REGULENT LA PROGRESSION MITOTIQUE PAR L'INTERMEDIAIRE DE LA PRODUCTION DE S1P	111
6. LA S1P REQUIERT LE RECEPTEUR S1P ₅ POUR CONTROLER LA PROGRESSION MITOTIQUE	116
7. DETERMINATION DES SIGNALISATIONS IMPLIQUEES EN AVAL DE LA VOIE SPHKs/S1P/S1P ₅	120
8. LA S1P N'ALTERE PAS L'ENTREE DES CELLULES EN MITOSE	123
9. LA SUREXPRESSION DES SPHKs ET LA S1P ALTERENT L'ALIGNEMENT DES CHROMOSOMES	125
10. LA SUREXPRESSION DES SPHKs ET LA S1P ALTERENT LA SEGREGATION DES CHROMOSOMES	129

11. LA S1P SEMBLE DIMINUER L'ACTIVITE DU SAC	131
12. LA S1P SEMBLE REDUIRE LA REPOSE DES CELLULES AUX POISONS DU FUSEAU MITOTIQUE	134
DISCUSSION GENERALE	137
1. LA VOIE DE SIGNALISATION SPHKs/S1P/S1P₅ REGULE LA PROGRESSION EN MITOSE	137
1.1. LES SPHKs ET LA S1P	137
1.2. LE RECEPTEUR S1P ₅	138
1.3. EN AVAL DU RECEPTEUR S1P ₅	138
2. REGULATION DE L'ACTIVITE DU SAC PAR LA VOIE SPHKs/S1P	139
3. CONSEQUENCES DE LA SUREXPRESSION DE LA VOIE SPHKs/S1P SUR LA STABILITE DU GENOME	142
4. SUREXPRESSION DE LA VOIE SPHKs/S1P ET SENSIBILITE A LA CHIMIOOTHERAPIE ANTI-MITOTIQUE	144
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	146
ANNEXE	179
1. MACRO IMAGE J DEVELOPEE POUR L'ANALYSE DE LA LOCALISATION KINETOCHORIENNE DE MAD2 ET DE BUBR1	180
2. ARTICLE AUTORISANT LA SOUTENANCE DE LA THESE	185

Résumé des travaux de thèse

La division cellulaire est cruciale pour le maintien de la stabilité du génome. Or, les gènes régulateurs de la mitose sont fréquemment mutés dans le cancer. Les cellules cancéreuses possèdent généralement un nombre anormal de chromosomes et la majorité des tumeurs solides sont aneuploïdes. Cette caractéristique favorise notamment l'initiation et la progression tumorale mais constitue également un facteur de mauvais pronostic et de résistance thérapeutique. La voie sphingosine kinases/sphingosine 1-phosphate (SphKs/S1P) régule la prolifération et la survie cellulaire, l'apoptose, la migration ou encore la réponse inflammatoire. De nombreuses études ont montré que sa surexpression favorise l'initiation et la progression tumorale mais également l'invasion, le processus métastatique et l'acquisition de résistance à la thérapie.

Mon projet de thèse vise à mettre à évidence le rôle de la voie SphKs/S1P dans la régulation de la mitose et de la ségrégation chromosomique. Nos résultats montrent pour la première fois que les SphKs contrôlent la progression mitotique. Cette régulation implique la production de S1P et son interaction avec son récepteur couplé aux protéines G, le S1P₅. La surexpression des SphKs ou la surproduction de S1P altèrent la ségrégation des chromosomes. De plus, nos données récentes suggèrent que la voie SphKs/S1P puisse être impliquée dans l'acquisition de résistance aux agents de chimiothérapie ciblant la mitose.

Nous montrons pour la première fois que la voie SphKs/S1P est un nouveau régulateur de la mitose. Ces travaux permettent de mieux comprendre comment la voie SphKs/S1P contribue au développement tumoral et renforcent leur intérêt comme cible thérapeutique dans le traitement du cancer.

Abstract

Cell division is a crucial process for genome maintenance. In cancer, numerous regulators of mitosis are mutated or altered, impeding the quality of chromosome segregation. Tumors exhibit a high chromosomal instability and are frequently aneuploid. These hallmarks promote tumor initiation and progression but are also associated with poor prognosis and therapeutic resistance. The sphingosine kinases/sphingosine 1-phosphate (SphKs/S1P) pathway is a key regulator of several fundamental biological processes including cell proliferation, survival, apoptosis, migration or inflammatory response. Numerous studies have shown that the up-regulation of the SphKs/S1P pathway promotes tumor initiation and progression, invasion, metastasis and resistance to anti-cancer therapies.

We are interested in the role of the SphKs/S1P pathway in cell division regulation. Our data indicate for the first time that SphKs regulate mitotic progression through S1P production and the interaction with its G protein-coupled receptor S1P₅. Furthermore, we showed that the up-regulation of the SphKs/S1P pathway impairs chromosome segregation. Finally, our recent data suggest that the SphKs/S1P pathway may be involved in the acquisition of resistance to mitotic chemotherapeutic agents.

Overall, we have identified the SphKs/S1P/S1P₅ pathway as a new genuine regulator of mitosis. We give support to the understanding of the implication of the SphKs/S1P pathway in tumoral progression and strengthen its interest as anti-cancer therapeutic targets.

Liste des abréviations

+TIPs	Microtubule Plus-end Tracking Proteins
³² P	Phosphate 32 (isotope radioactif du phosphate)
A β	Peptide β -amyloïde
ABC	ATP Binding Cassette
AC	Adénylate cyclase
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANOVA	Analysis of Variance
APC/C	Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome
APO	Apolipoprotein
APP	Amyloid- β Precursor Protein
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
Arpp19	cyclic-AMP-regulated phosphoprotein of 19 kDa
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3 related
BACE-1	β -site Amyloid Precursor Protein (APP) cleaving enzyme-1
BAK	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma extra large
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BH3	Bcl2 Homology domain 3
BRCA2	Breast Cancer 2
Brms1	Breast Carcinoma Metastasis Suppressor 1
BSA	Albumine sérique bovine
BUB	Budding Uninhibited by Benzimidazole
C1P	Céramide 1-phosphate
CAK	Cyclin Activating Kinase
CB	Cytoskeleton Buffer
CD	Cluster of Differentiation
Cdase	Céramidase
CDC	Cell Division Cycle
Cdk	Cyclin-dependant Kinase
CENP	Centromere Protein

CerK	Céramide kinase
CerS	Céramide synthase
CERT	Ceramide Transfer protein
CGT	Céramide galactosyltransférase
CIB1	Calcium and Integrin-Binding protein 1
CKI	Cdk Inhibitor
DAG	Diacylglycérol
Dam1	Duo1- and Mps1- interacting protein-1
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DGK	Diacylglycérol kinase
DHS	D,L-threodihydrosphingosine
DMS	<i>N,N</i> -diméthylsphingosine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
Edg	Endothelial Differentiation Gene
eEF1a	Elongation factor 1a
EGF	Epithelial Growth Factor
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor
EMA	Agence Européene du Médicament
eNOS	endothelial Nitric Oxyde Synthase
Ensa	α -Endosulfine
ER	Estrogen Receptor
Erk1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1/2
FACS	Cytométrie de flux
FAPP2	Four-Phosphate Adaptor Protein 2
FDA	Food and Drug Administration
G1	Gap-1
G2	Gap-2
GCS	Glucosylcéramide synthase
GDP	Guanosine diphosphate
GFP	Green Fluorescent Protein
GSK-3 β	Glycogen Synthase Kinase-3 β
GTP	Guanosine triphosphate
Gwl	Greatwall
H3 ^{S10P}	Histone H3 phosphorylée sur la S10
HDAC1/2	Histone Deacetylases 1/2
HDL	High Density Lipoprotein
HeLa	Henrietta Lacks
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HRE	Hypoxia inducible factor-Responsive Element

HRP	HorseRadish Peroxidase
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IKK β	Inhibitor of NF- κ B Kinase β
IL	Interleukine
INK4	Inhibitors of Cdk4
IP3	Inositol triphosphate
KLF2	Krüppel-like Factor 2
KO	Knock-out
LPA	Acide lysophosphatidique
LPS	Lipopolysaccharide
MAD	Mitotic-Arrested Deficient
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MASTL	Microtubule-Associated Serine Threonine-Like Kinase
MCC	Mitotic Checkpoint Complex
MCM	Mini Chromosome Maintenance
Mps1	Multipolar Spindle-1
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
NEB	Nuclear Enveloppe Breakdown
NES	Nuclear Export Signal
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NK	Natural Killer
NLS	Nuclear Localization Signal
ns	non significatif
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR β	Platelet-Derived Growth Factor Receptor β
PFA	Paraformaldéhyde
PHB	Prohibitine
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
PKC	Protéine kinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
Plk1	Polo-like Kinase 1
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
PP	Protein Phosphatase
pRb	Retinoblastoma protein
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
qRT-PCR	quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G

RE	Réticulum endoplasmique
RIP1	Receptor-Interacting Protein 1
ROCK	Rho-associated Protein Kinase
RPA	Replication Protein A
RPE1	Retinal Pigment Epithelial cells
S	Synthesis
S1P	Sphingosine 1-phosphate
S1PP	Sphingosine 1-phosphate phosphatase
SAC	Spindle Assembly Checkpoint
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SEM	Standard Error of Mean
SEP	Sclérose en plaques
SH3	Src Homology 3
siRNA	small interfering Ribonucleic Acid
SKA	Spindle- and Kinetochores-associated
Smase	Sphingomyélinase
SMS	Sphingomyéline Synthase
SphK	Sphingosine kinase
SPL	Sphingosine 1-phosphate lyase
Spns2	Spinster homolog 2
SPT	Sérine Palmitoyltransférase
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription-3
TGF- β	Tumor Growth Factor- β
T _H	Lymphocyte T auxiliaire
TLR	Toll-Like Receptor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TRAF2	Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 2
T _{reg}	Lymphocyte T régulateur
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Introduction générale

Chapitre 1. La division cellulaire ou mitose

1. Introduction au cycle cellulaire

1.1. De la cellule au cycle cellulaire

La cellule est l'unité structurale et fonctionnelle du vivant constituant les formes de vie les plus simples comme les organismes unicellulaires aux plus complexes à l'instar des organismes dits supérieurs composés de milliers de milliards de cellules organisées en tissus et en organes.

Le terme « cellule » tire son origine du latin *cellula* signifiant « petite chambre ». En 1665, le scientifique Robert Hooke découvre, à l'aide d'un microscope rudimentaire de sa conception, que le liège est constitué de multiples alvéoles dont l'organisation lui évoque les cellules monastiques. Il reproduit cette observation dans des plantes vivantes et donne à ces structures le nom de « cellule », bien que sa définition soit très différente du concept actuel. De nombreux scientifiques vont étudier la cellule et contribuer à l'établissement au XIX^e siècle de la théorie cellulaire. Notamment, les travaux de Matthias Jakob Schleiden et de Theodor Schwann établissent que les animaux et les végétaux sont tous constitués de cellules, unité structurale du vivant. Schwann décrit notamment la cellule comme une vésicule nucléée, délimitée par une membrane et étant le siège d'échanges nutritifs. Il propose cependant une origine des cellules erronée, basée sur la théorie de la génération spontanée en vogue à l'époque que Louis Pasteur réfutera. En 1858, Rudolf Virchow affirme que les cellules proviennent d'autres cellules (« *omnis cellula ex cellula* »), conjecturant le concept de la multiplication cellulaire par division.

En 1882, Walther Flemming publie la compilation de ses travaux dans un livre intitulé « *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung* » (Substance cellulaire, noyau et division cellulaire) où il utilise pour la première fois le terme « mitose » (issu du grec *mitos*, filament) pour évoquer la transformation du noyau qu'il observe au cours de la division (Flemming, 1882). Il découvre que le noyau des cellules contient une substance aisément colorable qu'il appelle chromatine (matériel colorable). Il décrit la division cellulaire telle que nous la connaissons aujourd'hui et en distingue deux phases. La première, progressive, consiste en la formation de filaments dans le noyau et en leur arrangement au centre de la cellule. La deuxième, régressive, débute avec la séparation de ces filaments en deux groupes et aboutit à la réapparition des noyaux des deux cellules filles (Paweletz, 2001). Flemming est ainsi le premier à décrire les mouvements des chromosomes — les filaments qu'il observe, le terme « chromosome » (corps colorable) n'apparaîtra que plus tard — et à constater que leur nombre est stable pour une espèce donnée. Il postule que chaque noyau est issu d'un noyau père contenant le même nombre de chromosomes.

En 1889, Richard Altmann prouve que la nucléine, substance riche en phosphore issue du noyau des cellules et caractérisée par Friedrich Miescher dès 1869, contient un acide qu'il nomme acide

nucléique. Plus tard, cet acide qui sera renommé acide désoxyribonucléique, ou ADN, est considéré comme le composant majeur des chromosomes. En 1952, Alfred Hershey et Martha Chase, dans la continuité des travaux de nombreux scientifiques comme Oswald Avery, Colin McLeod ou Maclyn McCarty, apportent la preuve irréfutable que l'ADN est le support de l'information génétique.

La description de la division cellulaire remonte donc à près de 150 ans, mais les scientifiques ont longtemps été limités à des observations à l'aide de microscopes et de colorations de tissus. Ce n'est qu'à partir de la seconde moitié du XX^e siècle que les incroyables progrès en biologie moléculaire ont permis aux biologistes cellulaires, aux biochimistes et aux généticiens de joindre leurs efforts pour percer les secrets de la régulation du cycle cellulaire. Les premiers travaux ont été menés sur des modèles simples comme les levures ou des oocytes d'oursin ou de xénope, puis ont été transposés à des organismes plus complexes comme les cellules de mammifères. La cristallisation des travaux fondateurs de nombreux scientifiques a conduit à l'établissement d'un modèle général de la régulation du cycle cellulaire. En 2001, le Prix Nobel de Médecine a été attribué conjointement à Leland Hartwell, Sir Timothy Hunt et Sir Paul Nurse pour leurs travaux pionniers sur les mécanismes moléculaires contrôlant le cycle cellulaire.

Chaque cellule eucaryote reçoit des informations de son environnement qui dirigent ses fonctions et son comportement. En réponse à des signaux prolifératifs, ou mitogènes, la cellule s'engage dans le processus de division dont l'aboutissement est la génération de deux cellules dites « filles » génétiquement identiques à la cellule « mère ». L'ensemble des étapes qui conduisent à cette finalité définit le cycle cellulaire. Historiquement, deux phases sont distinguées : l'interphase et la mitose (Figure 1).

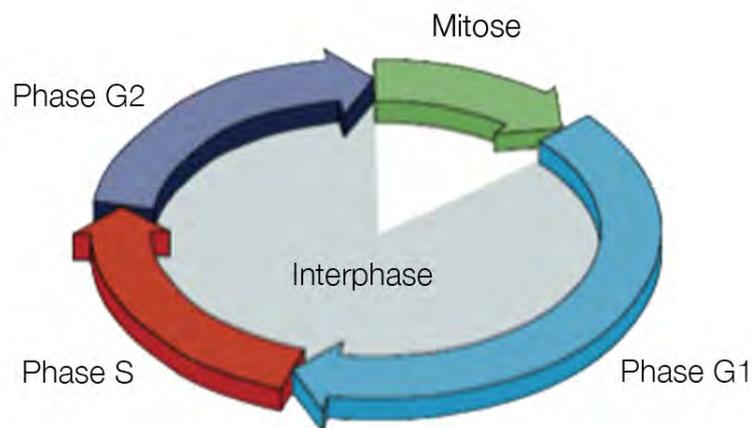


Figure 1. Représentation schématique du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire est subdivisé en phases successives. Les phases G1, S et G2 sont rassemblées sous la notion d'interphase. La phase de division cellulaire ou mitose est la dernière étape du cycle cellulaire.

1.2. L'interphase

L'interphase représente la quasi-totalité de la durée d'un cycle cellulaire. Elle rassemble tous les événements nécessaires à la préparation de la division. Elle est subdivisée en trois phases principales.

1.2.1. La phase G1

La phase G1 (*Gap-1*), appelée parfois G0/G1, correspond à la préparation de la cellule pour son entrée et sa progression dans le cycle. Si les conditions environnementales ne sont pas favorables à sa prolifération, c'est-à-dire si la cellule ne reçoit pas un certain nombre de signaux essentiels tels des facteurs de croissance, ou si elle reçoit des signaux antiprolifératifs, la cellule peut ne pas rentrer dans le cycle cellulaire. C'est le franchissement d'un point de décision majeur appelé point de restriction qui va définir l'entrée de la cellule dans le cycle cellulaire à proprement parler (Bartek et al., 1996; Blagosklonny and Pardee, 2002). Tant que la cellule n'a pas franchi ce point, elle peut rester dans une phase de quiescence, appelée G0, non-proliférative. Le point de restriction est levé par la stimulation et la présence dans l'environnement cellulaire suffisantes de facteurs prolifératifs, de nutriments, mais également quand la cellule atteint une certaine taille. Au-delà, sa progression dans le cycle cellulaire devient indépendante de ces facteurs. Cet aspect crucial du contrôle du cycle cellulaire empêche ainsi la division des cellules alors qu'elles n'y sont pas préparées.

Au cours de la phase G1, la cellule présente donc un fort métabolisme ainsi que d'intenses activités transcriptionnelle et traductionnelle aboutissant à sa croissance et à l'accumulation de métabolites divers, d'ARNm et de protéines. Un point de contrôle dit de dommages de l'ADN vérifie que l'état de l'ADN est bon pour permettre la poursuite dans le cycle cellulaire. Sinon, les cellules sont temporairement arrêtées pour permettre la réparation de l'ADN.

1.2.2. La phase S

Dans une cellule diploïde en G1, chaque chromosome est présent en deux copies et est formé par une seule chromatide. Or, lors de la division cellulaire, la cellule mère sépare son génome en distribuant une chromatide de chacun de ses chromosomes aux deux cellules filles. Il est donc nécessaire que la cellule duplique ses chromatides avant qu'elle ne se divise. Ceci est effectué lors de la phase S (*Synthesis*). La cellule réplique son ADN, aboutissant à la création d'une deuxième chromatide par chromosome.

La réplication de l'ADN se fait selon un mode dit semi-conservatif. Brièvement, sous l'action d'hélicases, la double hélice d'ADN est localement déroulée permettant à la machinerie répliquative complexe dont les acteurs phares sont les ADN polymérases de synthétiser deux nouveaux brins à partir des deux parentaux. Cette synthèse se doit d'être la plus précise possible pour ne pas introduire de mutations dans les néo-brins d'ADN.

L'ADN n'est pas le seul à être répliqué au cours de la phase S. Un organe intracellulaire crucial pour la division cellulaire est également dupliqué : il s'agit du centrosome. Le centrosome est considéré comme le centre organisateur principal des microtubules, des polymères de tubuline composants du cytosquelette. Cet organe est composé de deux centrioles disposés

perpendiculairement l'un à l'autre baignant dans une matrice péricentriolaire. Cette matrice contient notamment des complexes d'anneaux de γ -tubuline qui servent à la nucléation des microtubules. En G1, une cellule normale possède un seul centrosome. Dès lors de la transition G1/S, les deux centrioles, dits alors pères, s'éloignent l'un de l'autre et sont dupliqués selon un mode semi-conservatif, chacun donnant un centriole dit fils. Les deux centrosomes, formés d'une paire de centrioles père-fils, vont ensuite subir une maturation jusqu'à la phase de division cellulaire (Doxsey et al., 2005).

1.2.3. La phase G2

Après avoir répliqué son génome, la cellule entre en G2 (*Gap-2*). Au cours de cette phase, de nombreux mécanismes vérifient si l'état de la cellule lui permet d'effectuer la phase de division. L'état de l'ADN est notamment analysé et des processus de réparation sont mis en place en cas de lésions induites par des défauts de réplication au cours de la phase S ou par divers stress ou agents intra- et extracellulaires. Durant la G2, la cellule prépare également sa transition vers la mitose en synthétisant et en accumulant tous les régulateurs requis pour cette phase.

1.3. La mitose, phase de division cellulaire

La division cellulaire ou mitose est l'ensemble des événements de séparation du génome (caryocinèse), du corps et des composants (cytocinèse) d'une cellule mère en deux cellules filles. On distingue généralement six étapes (Figure 2).

1.3.1. La prophase

L'entrée des cellules en mitose est marquée par de profonds remodelages de sa morphologie et de ses organites. Un intense remaniement du cytosquelette d'actine conduit à son arrondissement et la rigidification du cortex cellulaire. Ces étapes précoces sont cruciales pour le reste de la division cellulaire (Kunda and Baum, 2009). Le réseau de microtubules interphasique est désassemblé et les centrosomes sont le siège d'une forte activité de nucléation qui aboutira à la formation du fuseau mitotique, le vecteur de la ségrégation chromosomique. Des arrangements radiaux de microtubules courts et dynamiques appelés asters émanent de chaque centrosome et vont devenir les deux pôles du fuseau mitotique. Les centrosomes se séparent en migrant le long de l'enveloppe nucléaire.

Au cours de la prophase, le nucléole disparaît et les chromosomes commencent à se condenser. Les deux chromatides sœurs de chaque chromosome sont reliées par une zone hypercondensée appelée centromère. Des protéines comme la cohésine assurent également leur cohésion. Sur chaque chromosome, de part et d'autre du centromère, de nombreuses protéines sont recrutées et forment une plaque extrêmement structurée appelée kinétochore.

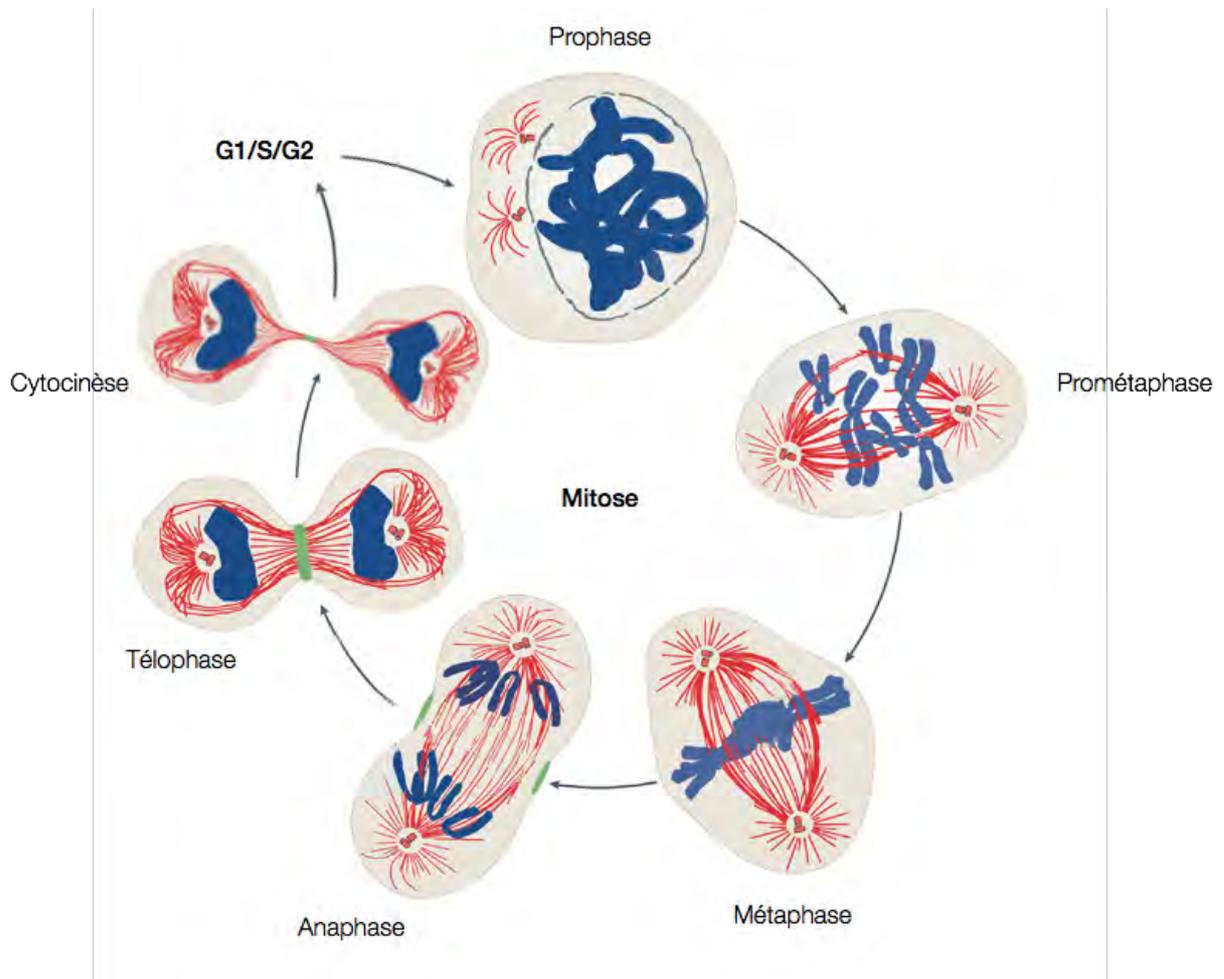


Figure 2. Les étapes de la mitose. En prophase, les chromosomes (en bleu) commencent à se condenser et les centrosomes débutent l'établissement du fuseau mitotique (en rouge). En prométaphase, l'enveloppe nucléaire est rompue et les microtubules commencent à capturer et à aligner les microtubules à l'équateur de la cellule. En métaphase, tous les chromosomes sont alignés au niveau de la plaque métaphasique. En anaphase, les deux lots de chromatides sœurs sont ségrégués et la cellule s'allonge suite à l'élongation du fuseau mitotique. Un anneau contractile d'actine et de myosine (en vert) s'assemble à l'équateur de la cellule. En télaphase, les noyaux des deux cellules filles commencent à se reformer. L'anneau contractile commence la séparation du corps de la cellule. En cytokinèse, seul un pont intracellulaire persiste entre les deux cellules filles. Il sera finalement rompu lors de l'abscission parfois plusieurs heures après la fin de la mitose. Adapté librement de (Ruchaud et al., 2007).

1.3.2. La prométaphase

Le début de la prométaphase est marqué par la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEB, *Nuclear Enveloppe Breakdown*). Les chromosomes deviennent donc accessibles au fuseau mitotique. Leur condensation est quasiment maximale et ils adoptent une forme bien caractéristique en X.

1.3.2.1. Le fuseau mitotique

Avant de discuter de la fonction du fuseau mitotique, il convient de préciser l'organisation de cette structure hautement complexe et spécialisée. Le fuseau mitotique est une machine dynamique composée de microtubules et de protéines régulatrices. Les microtubules sont des structures polarisées, continuellement soumis à des événements d'élongation par polymérisation et de

raccourcissement par dépolymérisation au niveau de leurs extrémités. A l'extrémité « + », l'équilibre tend plutôt vers la polymérisation alors que l'extrémité « - » a tendance à se raccourcir. La longueur d'un microtubule dépend donc de la fréquence de la transition d'une phase d'élongation à une phase de raccourcissement, appelée catastrophe, et de la transition inverse appelée sauvetage, à chacune de ses extrémités. Dans le fuseau mitotique, les microtubules sont ancrés par leur extrémité « - » aux centrosomes, ce qui la stabilise. *De facto*, la longueur des microtubules dans le fuseau dépend essentiellement de la fréquence de catastrophes/sauvetage à son extrémité « + ». De nombreuses protéines regroupées sous le terme +TIPs (*Microtubule Plus-end Tracking Proteins*) interagissent avec cette extrémité pour réguler la dynamique des microtubules (Akhmanova and Steinmetz, 2010).

Trois types de microtubules vont être polymérisés depuis les pôles pour former un fuseau mitotique mature (Scholey et al., 2003). Les microtubules dits astraux sont dirigés vers le cortex cellulaire où ils interagissent avec le cytosquelette cortical d'actine *via* de nombreux moteurs protéiques et participent au positionnement du fuseau mitotique dans la cellule (Kunda and Baum, 2009). Des microtubules interpolaire et kinétochoriens, plus longs, sont établis entre les pôles du fuseau. Les premiers sont interdigités et serviront à éloigner les deux pôles l'un de l'autre au cours des phases tardives de la mitose, alors que les seconds interagissent avec les chromosomes (Scholey et al., 2003) (Figure 3).

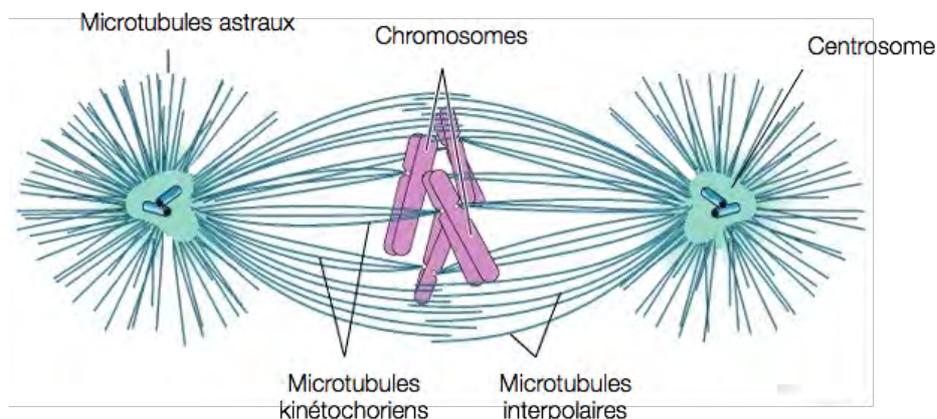


Figure 3. Le fuseau mitotique. A l'entrée en mitose, les centrosomes sont le siège d'une intense activité de nucléation et assemblent le fuseau mitotique, vecteur de la ségrégation chromosomique. Cette structure est composée de trois types de microtubules aux fonctions distinctes. Les microtubules astraux sont dirigés vers le cortex cellulaire et participent au positionnement du fuseau dans la cellule. Les microtubules kinétochoriens capturent et alignent les chromosomes au niveau de la plaque métaphasique. Les microtubules interpolaire sont interdigités et permettent l'élongation du fuseau au cours des phases tardives de la mitose.

Les microtubules du fuseau sont parcourus par des protéines motrices comme les kinésines et les dynéines. Ces transporteurs glissent le long des microtubules dans un sens préférentiel selon leur type et prennent en charge divers cargos, notamment les microtubules eux-mêmes. Ainsi, ces

moteurs peuvent établir les liaisons transverses entre les microtubules et les déplacer les uns par rapport aux autres par glissement (Gatlin and Bloom, 2010).

1.3.2.2. *Capture et alignement des chromosomes*

Les microtubules kinétochoriens explorent le cytoplasme et capturent les chromosomes en interagissant avec leurs kinétochores. Pour un chromosome donné, un pôle du fuseau ne doit capturer qu'un seul kinétochore, laissant l'autre accessible par l'autre pôle, de façon à ce que le chromosome soit attaché de façon bipolaire. Comme nous le verrons plus tard, une importante machinerie est impliquée dans la régulation de cette capture. Par une composante de forces de tension et de traction exercées par le fuseau au niveau des kinétochores résultant notamment de l'action de nombreux régulateurs à la fois de la polymérisation et de la dépolymérisation des microtubules mais également du déplacement des chromosomes le long des microtubules, et des microtubules les uns par rapport aux autres, les chromosomes sont déplacés dans la cellule et alignés en une plaque métaphasique à l'équateur de la cellule.

1.3.3. La métaphase

La métaphase correspond au subtil moment où tous les chromosomes sont orientés de façon bipolaire par le fuseau et alignés dans la plaque métaphasique à mi-distance des deux pôles du fuseau. Les forces de tension et de traction de part et d'autre des kinétochores sont proches de l'égalité et la cellule va pouvoir ségréger ses chromosomes en deux lots.

1.3.4. L'anaphase

Les protéines assurant la cohésion entre les chromatides sont dégradées et les chromatides sœurs sont ségrégées en deux lots identiques. D'abord, les chromosomes sont attirés vers les pôles du fuseau (anaphase A) notamment par la dépolymérisation des microtubules kinétochoriens, puis les pôles s'éloignent l'un de l'autre sous l'action de moteurs protéiques qui écartent les microtubules interpolaires interdigués, induisant un allongement cellulaire (anaphase B).

Les microtubules interpolaires sont réorganisés pour former le fuseau central. A l'équateur de la cellule, ils induisent une signalisation sous le contrôle de nombreux régulateurs dont la GTPase RhoA et ses effecteurs qui provoque l'assemblage d'un anneau cortical d'actine et de myosine. Henrik Bringmann et Anthony Hyman ont montré dans une étude élégante que le positionnement du plan de clivage semble dépendre d'une signalisation émanant d'une part des microtubules astraux et du cortex cellulaire, et d'autre part des microtubules du fuseau central (Bringmann and Hyman, 2005).

1.3.5. La télophase

Durant la télophase, l'enveloppe nucléaire est progressivement reformée autour des chromosomes pour constituer les noyaux des deux cellules filles. L'anneau se contracte, provoquant une invagination de la membrane plasmique.

1.3.6. La cytokinèse

La cytokinèse consiste en la séparation du corps de la cellule mère en deux cellules filles sous l'effet de la contraction maximale de l'anneau acto-myosique. Cette contraction aboutit à la formation d'un pont intercellulaire reliant les deux cellules filles. Au centre de ce pont, on retrouve une structure particulière appelée le corps intermédiaire (ou *midbody*). Caractérisé pour la première fois en 1891 par Walther Flemming, le corps intermédiaire est un conglomerat protéique très dense aux électrons présumé jouer un rôle durant l'abscission — la rupture du pont intracellulaire, se déroulant parfois plusieurs heures après la fin de la mitose — mais également dans le devenir post-mitotique des cellules filles (Ettinger et al., 2011).

2. Régulation de la progression dans le cycle cellulaire

La progression dans le cycle cellulaire est un processus complexe, précisément régulé par des mécanismes moléculaires fortement conservés au cours de l'évolution. Les transitions entre les différentes phases sont déclenchées par un ensemble de phosphorylations et de déphosphorylations par des protéines kinases et phosphatases clés.

2.1. Les complexes Cdk/cycline

2.1.1. Les Cdks et les cyclines

Les Cdks (*Cyclin-dependant Kinases*) sont une famille de sérine/thréonine kinases qui interagissent avec des partenaires régulateurs, les cyclines, pour contrôler la progression dans le cycle cellulaire. La première Cdk est identifiée par Paul Nurse *et al.* en 1975 qui décrivent plusieurs gènes contrôlant l'entrée en mitose chez la levure dont le régulateur clé *CDC2* (*Cell Division Cycle 2*) (Nurse, 1975), connu comme *CDK1* chez l'homme. Quelques années plus tard, en 1983, Tim Hunt *et al.* découvrent la première cycline. En observant le comportement de cette nouvelle protéine, dont l'expression augmente avant la mitose puis chute drastiquement après, Tim Hunt écrit : « *Il est difficile de croire que le comportement des cyclines n'est pas connecté aux processus impliqués dans la division cellulaire* » et suggère que la synthèse de cette protéine déclenche l'entrée en mitose alors que sa dégradation permet la fin d'un cycle cellulaire et le début d'un nouveau (Evans et al., 1983). Il faut cependant attendre 1990 pour comprendre que les Cdks et les cyclines interagissent entre elles (Nurse, 1990). Les bases de la régulation de la progression dans le cycle cellulaire sont posées.

2.1.2. Régulation des complexes Cdk/cycline

L'activité kinase des Cdks est étroitement régulée à différents niveaux impliquant l'interaction avec des partenaires activateurs : les cyclines, ou inhibiteurs : les CKIs (*Cdk Inhibitors*), leurs phosphorylations/déphosphorylations ou encore leur localisation subcellulaire (Malumbres and Barbacid, 2005).

Chaque Cdk se lie préférentiellement à une ou à plusieurs cyclines pour former un complexe Cdk/cycline actif. Cette interaction induit un changement conformationnel de la Cdk et augmente fortement son activité kinase (Connell-Crowley et al., 1993). Ainsi, les cyclines sont cruciales pour la

régulation des Cdks. Or, leur expression est oscillatoire ce qui permet de réguler de façon fine l'activité des complexes Cdk/cyclines au cours du cycle cellulaire (Pines, 1999).

Les CKIs sont divisés en deux familles. Les INK4 (*Inhibitors of Cdk4*) p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d} se lient à Cdk4 et à Cdk6 sous leur forme monomérique et bloquent leur interaction avec la cycline D. Les Cip/Kip p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2} se lient et inhibent les différents complexes Cdk/cycline (Besson et al., 2008). Les CKIs ont un rôle important dans la coordination de la progression dans le cycle cellulaire, leur activité est donc finement régulée au cours du cycle notamment par le niveau de leur expression ainsi que par leur localisation subcellulaire.

Cependant, pour que les complexes Cdk/cycline soient complètement activés, les Cdks doivent être phosphorylés ou déphosphorylés sur des résidus particuliers conservés dans leur séquence. Dans le cas de Cdk1, régulateur clé de l'entrée et de la progression en mitose, son activation requiert d'une part l'interaction avec la cycline B, et d'autre part sa phosphorylation sur la T161 par la CAK (*Cyclin Activating Kinase*), et la déphosphorylation des résidus T14 et Y15, cibles des kinases inhibitrices Wee1 et Myt1, par les phosphatases de la famille Cdc25 (Lundgren et al., 1991; Strausfeld et al., 1991).

2.1.3. Régulation du cycle cellulaire par les complexes Cdk/cycline

Aujourd'hui, une vingtaine de Cdks ont été identifiées chez l'homme, pour une trentaine de protéines considérées comme des cyclines. Chaque transition entre deux phases du cycle est régulée par un ou plusieurs complexes de Cdk/cycline (Figure 4) (Malumbres and Barbacid, 2005).

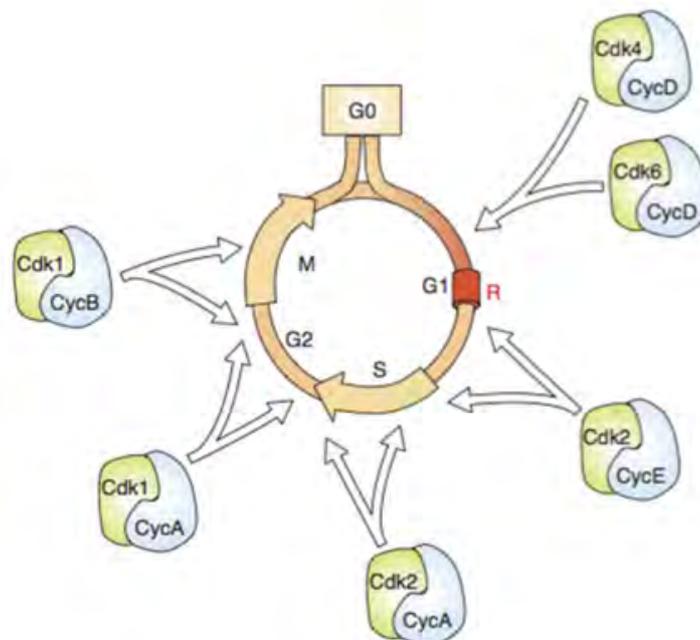


Figure 4. Les complexes Cdk/cycline et la progression dans les phases du cycle cellulaire. Ce schéma présente les principaux complexes Cdk/cycline et indique les phases du cycle où ils agissent. R, point de restriction. Simplifié de (Malumbres and Barbacid, 2005).

La progression en G1 dépend notamment des complexes Cdk4/cycline D et Cdk6/cycline D. Sous l'action de signaux mitogènes, la synthèse des cyclines de type D est stimulée, ainsi que la translocation nucléaire de Cdk4 et de Cdk6. Une fois formés, les complexes Cdk4/cycline D et Cdk6/cycline D phosphorylent notamment des protéines comme pRb (*Retinoblastoma protein*). pRb est un répresseur de nombreux facteurs de transcription comme ceux de la famille E2F. La phosphorylation de pRb la dissocie des facteurs E2F et permet l'expression de leurs gènes cibles. Cet événement constitue le franchissement du point de restriction. Parmi les gènes cibles des facteurs E2F, on trouve les cyclines de type E qui peuvent s'associer à Cdk2. Le complexe Cdk2/cycline E parachève l'inhibition de pRb et déclenche la transition G1/S (Malumbres and Barbacid, 2005).

Le complexe Cdk2/cycline E est essentiel à l'initiation de la réplication de l'ADN. Il permet notamment le recrutement des protéines MCM (*Mini Chromosome Maintenance*) au niveau des origines de réplication, et phosphoryle plusieurs régulateurs des histones (protéines chaperonnes de l'ADN), de la réplication et de la réparation de l'ADN, mais également de la duplication et de la maturation des centrosomes (Hinchcliffe and Sluder, 2002; Malumbres and Barbacid, 2005). Il phosphoryle son inhibiteur p27^{Kip} pour induire sa dégradation par le protéasome.

Au cours de la phase S, le complexe Cdk2/cycline E doit être inactivé pour empêcher des cycles de re-réplication de l'ADN. Cette inactivation repose sur la dégradation de la cycline E par le protéasome (Nakayama et al., 2001). En parallèle, l'inactivation de pRb contribue également à la transcription de gènes essentiels aux phases suivantes du cycle cellulaire, notamment les cyclines de type A et B. En S, l'accumulation de la cycline A d'une part et la dégradation de la cycline E d'autre part favorise la formation du complexe Cdk2/cycline A. Ce nouveau complexe phosphoryle de nombreuses protéines impliquées dans la sortie de la phase S (Malumbres and Barbacid, 2005).

Au cours de la G2, la cycline A s'associe à Cdk1 et ce complexe phosphoryle des protéines qui participent au contrôle de la progression dans le cycle cellulaire comme p53 ou la réparation de dommages à l'ADN telle BRCA2 (*Breast Cancer 2*). La dégradation de la cycline A et l'expression active de la cycline B induisent la formation du complexe Cdk1/cycline B, régulateur clé de l'entrée et de la progression en mitose.

En phosphorylant de très larges cibles, le complexe Cdk1/cycline B régule de façon majeure les événements de la mitose. Au niveau des centrosomes, il phosphoryle la kinésine Eg5 qui assure leur séparation. Il participe à la condensation des chromosomes en phosphorylant notamment des histones, et à la rupture de l'enveloppe nucléaire en phosphorylant les lamines qui la soutiennent et les composants des pores. Le complexe Cdk1/cycline B a également pour substrats des protéines associées aux microtubules, ou encore de nombreux régulateurs de la progression mitotique comme le cofacteur Cdc20 de l'E3 ubiquitine ligase APC/C (*Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome*). Finalement, pour permettre la sortie de la mitose, le complexe Cdk1/cycline B doit être inactivé. Ceci

s'accomplit par la dégradation de la cycline B à la transition métaphase-anaphase suite à son ubiquitylation par l'APC/C (Malumbres and Barbacid, 2005).

2.2. Les phosphatases régulatrices du cycle cellulaire

La découverte des complexes Cdk/cycline comme les régulateurs majeurs du cycle a mis l'accent sur l'importance de très nombreuses kinases et phosphorylations impliquées dans les transitions et la progression des différentes phases. Cependant, il est clair que si ces transitions requièrent notamment des complexes Cdk/cyclines actifs et leurs signalisations, elles nécessitent également leurs inactivations. La régulation des complexes Cdk/cyclines est effectuée de façon fine au cours du cycle cellulaire (cf. 2.1). De nombreuses phosphatases sont impliquées dans la régulation de ces complexes et de leurs effecteurs, permettant de retourner à un niveau basal d'activité, ou d'inhiber des voies pour permettre la progression dans le cycle.

2.2.1. Les phosphatases Cdc25

La famille Cdc25 comporte trois membres chez les mammifères : Cdc25A, Cdc25B et Cdc25C. Ces phosphatases sont capables d'hydrolyser les phospho-tyrosines et les phospho-sérines/thréonines. Elles sont impliquées dans la déphosphorylation activatrice des Cdks, régulant *de facto* les transitions du cycle cellulaire et notamment l'entrée en mitose où elles induisent l'activation complète du complexe Cdk1/cycline B (cf. 2.1.2) (Aressy and Ducommun, 2008).

2.2.2. La famille des protéine phosphatases

Les protéine phosphatases (PPs) sont une large famille de sérine/thréonine et de tyrosine phosphatases connues pour réguler notamment de nombreux événements du cycle cellulaire comme la mitose (Mochida and Hunt, 2012). Les implications de ces phosphatases ont largement été étudiées ces dernières années, aboutissant à une meilleure compréhension des événements de phosphorylation et de déphosphorylation observés et requis pour le déroulement correct de la mitose. La protéine phosphatase PP2A-B55 δ est particulièrement impliquée dans la déphosphorylation des substrats du complexe Cdk1/cycline B. Chez le xénope, à l'entrée en mitose, l'activité de la kinase Greatwall (Gwl) augmente en partie suite à sa phosphorylation par Cdk1. Deux de ses substrats sont les protéines Ensa (α -Endosulfine) et Arpp19 (*cyclic-AMP-regulated phosphoprotein of 19 kDa*) qui, sous leur forme phosphorylée, sont des inhibiteurs spécifiques de PP2A-B55 δ (Gharbi-Ayachi et al., 2010; Mochida et al., 2010). Après la dégradation de la cycline B à la transition métaphase/anaphase par le protéasome, l'activité Cdk1 est fortement réduite. L'activité de Gwl diminue également induisant une réactivation de PP2A-B55 δ et la déphosphorylation massive de ses substrats (Lorca and Castro, 2013; Mochida and Hunt, 2012). Ce modèle a été validé chez l'homme avec l'identification de l'orthologue humain de Gwl, la kinase MASTL (*Microtubule-Associated Serine Threonine-Like Kinase*).

2.3. Les points de contrôle du cycle cellulaire

La progression coordonnée dans le cycle cellulaire est un processus complexe pour la cellule eucaryote. Il existe plusieurs points de contrôle au cours du cycle agissant comme des mécanismes de surveillance pour assurer la fidélité de la division cellulaire (Figure 5). Ces points de contrôle vérifient l'exécution des processus cruciaux à chaque phase du cycle cellulaire avant de permettre la progression dans la phase suivante. En revanche, si des anomalies sont constatées, ces points de contrôle agissent comme des barrières et induisent un arrêt dans le cycle pour permettre leur correction. Ces points de contrôle font appel à une signalisation moléculaire extrêmement sophistiquée initiée par des senseurs qui évaluent l'état des paramètres qu'ils surveillent. Ces senseurs activent, si besoin est, des médiateurs et des effecteurs qui relaient un signal de pause dans le cycle cellulaire et permettent le recrutement de réparateurs pour corriger les erreurs constatées.

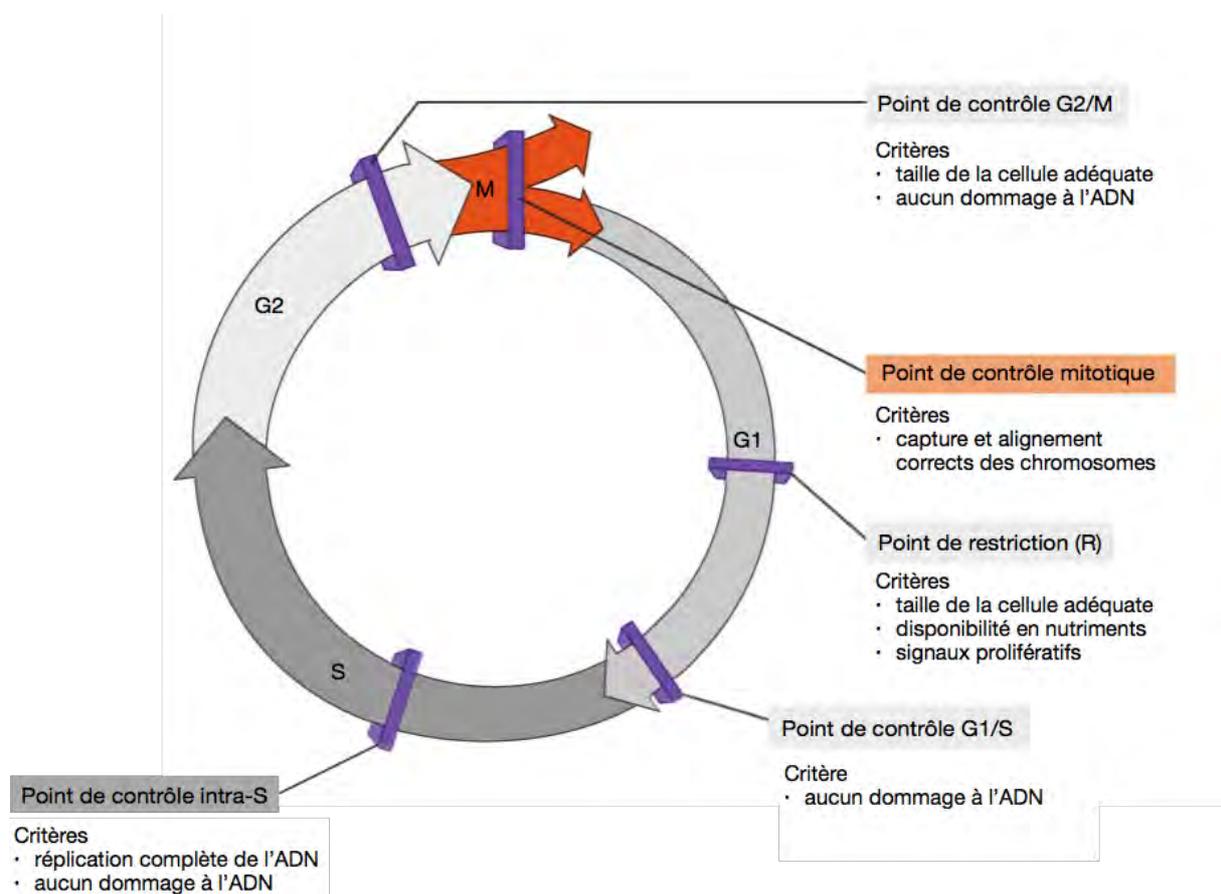


Figure 5. Les points de contrôle du cycle cellulaire. Ce schéma indique les différents points de contrôle régulant la progression dans le cycle et les critères qu'ils évaluent. Adapté d'un document en ligne de l'Université de Kenyon.

Un point de contrôle a été décrit pour chaque phase du cycle cellulaire. Les trois premiers prennent place au cours des phases G1, S et G2 du cycle cellulaire. Ils contrôlent l'état de la molécule d'ADN et détectent les différentes lésions qu'elle peut subir en réponse à attaques permanentes

occasionnées par des stress endogènes ou des agents extérieurs. Très brièvement, en présence de cassures double brin de l'ADN, le complexe MRN (Mre11, Rad50, Nbs1) recrute ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) au dommage qui phosphoryle l'histone H2AX, créant le phosphoépitope γ H2AX impliqué dans le recrutement de nombreuses protéines de la signalisation de la réparation de l'ADN (Kastan and Bartek, 2004; Reinhardt and Yaffe, 2013). En réponse à des cassures simple brin, la protéine RPA (*Replication Protein A*) recrute ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3 related*) à l'ADN. ATM et ATR phosphorylent et activent respectivement Chk2 et Chk1. Ces deux signalisations aboutissent à l'inhibition des phosphatases Cdc25 d'une part, et activent le facteur de transcription suppresseur de tumeur p53 qui stimule l'expression du CKI p21^{Cip1} d'autre part, conduisant à une inhibition des complexes Cdk/cycline et à un blocage de la progression dans le cycle cellulaire. En parallèle, des effecteurs de la réparation de l'ADN sont activés et recrutés pour résoudre les lésions. Une fois les corrections effectuées, la signalisation du point de contrôle s'arrête et le cycle peut reprendre (Reinhardt and Yaffe, 2013).

Un autre point de contrôle très différent des précédents décrits plus haut est actif au cours de la mitose. Son rôle est capital dans le contrôle de la ségrégation des chromosomes. Contrairement à ceux établis en interphase, ce point de contrôle n'évalue pas l'état de l'ADN mais des paramètres beaucoup plus subtils inhérents à la fonction du fuseau mitotique comme nous allons le voir en détail dans la partie suivante.

3. Le Spindle Assembly Checkpoint

Au cours de la prométaphase, le fuseau mitotique capture les chromosomes au niveau de leurs kinétochores avant de les aligner au niveau de la plaque métaphasique. Pour que les chromosomes soient ségrégués correctement entre les deux cellules filles, les kinétochores de chaque chromosome doivent établir des connexions stables avec les deux pôles du fuseau par l'intermédiaire des microtubules kinétochoriens. Pour chaque chromosome, un kinétochore doit être capturé par un pôle de façon à générer un attachement dit amphitélique (Figure 6). Ce type d'attachement bipolaire conduit à l'alignement correct du chromosome au niveau de la plaque métaphasique. Cependant, des attachements incorrects peuvent être générés. Premièrement, le chromosome peut n'être capturé que par un kinétochore, l'autre restant libre, définissant un attachement monotélique. Si les deux kinétochores d'un même chromosome sont capturés par le même pôle du fuseau, l'attachement est dit syntélique. Enfin, dans des cas dits d'attachement mérotélique, un même kinétochore peut être relié simultanément aux deux pôles du fuseau (Figure 6). Des mécanismes de détection et de correction de ces attachements incorrects existent dans la cellule (Khodjakov and Pines, 2010; Musacchio and Salmon, 2007).

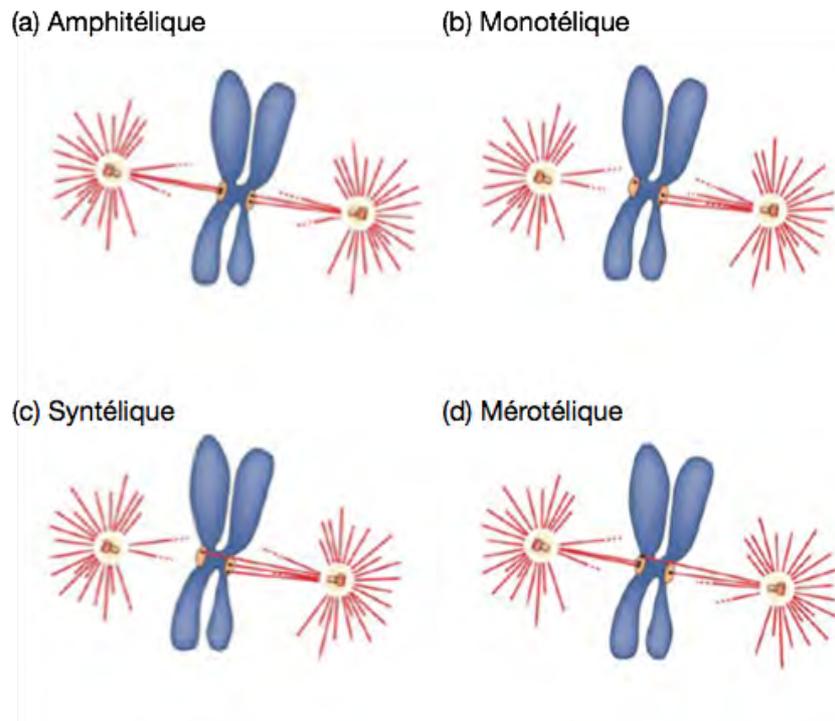


Figure 6. Les différents types d'attachement entre les kinétochores et le fuseau. (a) Exemple d'attachement amphitélétique. Les microtubules kinétochoriens issus de chaque pôle du fuseau capturent le chromosome chacun au niveau d'un kinétochore. Seul ce type d'attachement est correct et permet une ségrégation équitable des chromatides sœurs entre les deux cellules filles. (b) Exemple d'attachement monotélétique. Un seul kinétochore est capturé par le fuseau, l'autre reste libre. (c) Exemple d'attachement syntélétique. Les deux kinétochores d'un même chromosome sont capturés par les microtubules kinétochoriens issus d'un même pôle du fuseau. (d) Exemple d'attachement mérotélétique. Un même kinétochore est capturé simultanément par les microtubules kinétochoriens émanants des deux pôles du fuseau. Adapté de (Ruchaud et al., 2007).

L'interaction entre les microtubules et les kinétochores étant un événement stochastique, il faudra un temps variable pour que tous les chromosomes soient capturés par le fuseau. De plus, il est rare que les deux kinétochores d'un même chromosome interagissent avec le fuseau simultanément. Dans un premier temps, les chromosomes se retrouvent plutôt attachés de façon monotélétique au fuseau mitotique (Figure 6) (Khodjakov and Pines, 2010). Cependant, si la cellule se divise avant que tous les kinétochores ne soient attachés au fuseau, des gains et des pertes de chromosomes peuvent être occasionnés, générant des cellules filles aneuploïdes. Dans le cas d'un attachement syntélétique ou monotélétique, si la cellule se divise, une cellule fille recevra les deux chromatides sœurs et l'autre aucune. Pour un attachement mérotélétique, lors de la ségrégation des chromosomes, un tel attachement induira une opposition des forces de traction par les deux pôles qui maintiendra le chromosome à l'équateur de la cellule – on parle de chromosome retardataire (*lagging chromosome*).

Le *Spindle Assembly Checkpoint* (SAC), encore appelé point de contrôle mitotique, prévient la séparation des chromatides sœurs tant que tous les kinétochores ne soient capturés et alignés par le fuseau mitotique. Il suffit qu'un seul kinétochore reste libre pour retarder l'entrée en anaphase

pendant des heures (Rieder et al., 1995). Ainsi le SAC fournit le temps nécessaire aux cellules pour qu'elles capturent et alignent correctement tous leurs chromosomes en une plaque métaphasique.

3.1. Bases moléculaires du fonctionnement du SAC

Il est établi depuis longtemps que dans une cellule animale normale, l'anaphase n'est déclenchée qu'une fois que tous les chromosomes sont disposés au centre du fuseau mitotique (Zirkle, 1970). Cependant, les paramètres évalués par la cellule pour retarder la transition métaphase/anaphase étaient inconnus.

3.1.1. Identification des principales protéines du SAC

En 1991, deux études de criblage menées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* identifient plusieurs gènes dont la mutation altère la capacité des cellules à s'arrêter en mitose en présence de poisons du fuseau (Hoyt et al., 1991; Li and Murray, 1991). Les gènes *MAD* (*Mitotic-Arrested Deficient*) *MAD1*, *MAD2* et *MAD3* (*BUBR1* chez l'homme) ainsi que *BUB* (*Budding Uninhibited by Benzimidazole*) *BUB1* et *BUB3* sont notamment caractérisés. Ces gènes sont conservés chez tous les eucaryotes et sont impliqués dans une voie de signalisation active dès la prométaphase et qui prévient la séparation précoce des chromatides sœurs : il s'agit du SAC (Musacchio and Hardwick, 2002; Taylor et al., 2004).

La transition métaphase—anaphase est marquée par la dégradation de nombreux régulateurs de la progression mitotique. La cycline B, Le SAC cible la protéine Cdc20, co-facteur du complexe ubiquitine ligase APC/C, en régulant négativement sa capacité à l'activer et à l'ubiquitinylation de ses substrats clés comme la cycline B et la sécurine (Hwang et al., 1998; Kim et al., 1998). La sécurine est un inhibiteur de la séparase, une protéase dégradant la cohésine qui maintient les chromatides associées et dont le clivage est requis pour l'anaphase (Peters, 2006). La protéolyse de la cycline B permet l'inactivation de Cdk1 et de promouvoir la sortie de la mitose. Ainsi, en ciblant Cdc20, le SAC retarde ces événements, rallongeant la durée de la prométaphase jusqu'à ce que tous les chromosomes soient capturés et alignés par le fuseau (Figure 7).

Les différents effecteurs du SAC forment un complexe appelé MCC (*Mitotic Checkpoint Complex*) comportant notamment Mad2, BubR1, Bub3, et Cdc20 (Musacchio and Salmon, 2007). Outre le complexe MCC, d'autres acteurs clés du SAC ont été caractérisés. On distingue notamment Mad1, et les kinases Mps1 (*Multipolar Spindle-1*) et Aurora B. Ces protéines sont notamment requises pour l'initiation et l'amplification de la formation du MCC et la signalisation du SAC. De plus, de nombreux régulateurs de l'activité du SAC ont été mis en évidence comme p31^{comet}, MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), le complexe Cdk1/cycline B, Plk1 (*Polo-like Kinase 1*), ou encore la protéine centromérique CENP-E (*Centromere Protein-E*, également connue comme la kinésine-7) (Musacchio and Salmon, 2007).

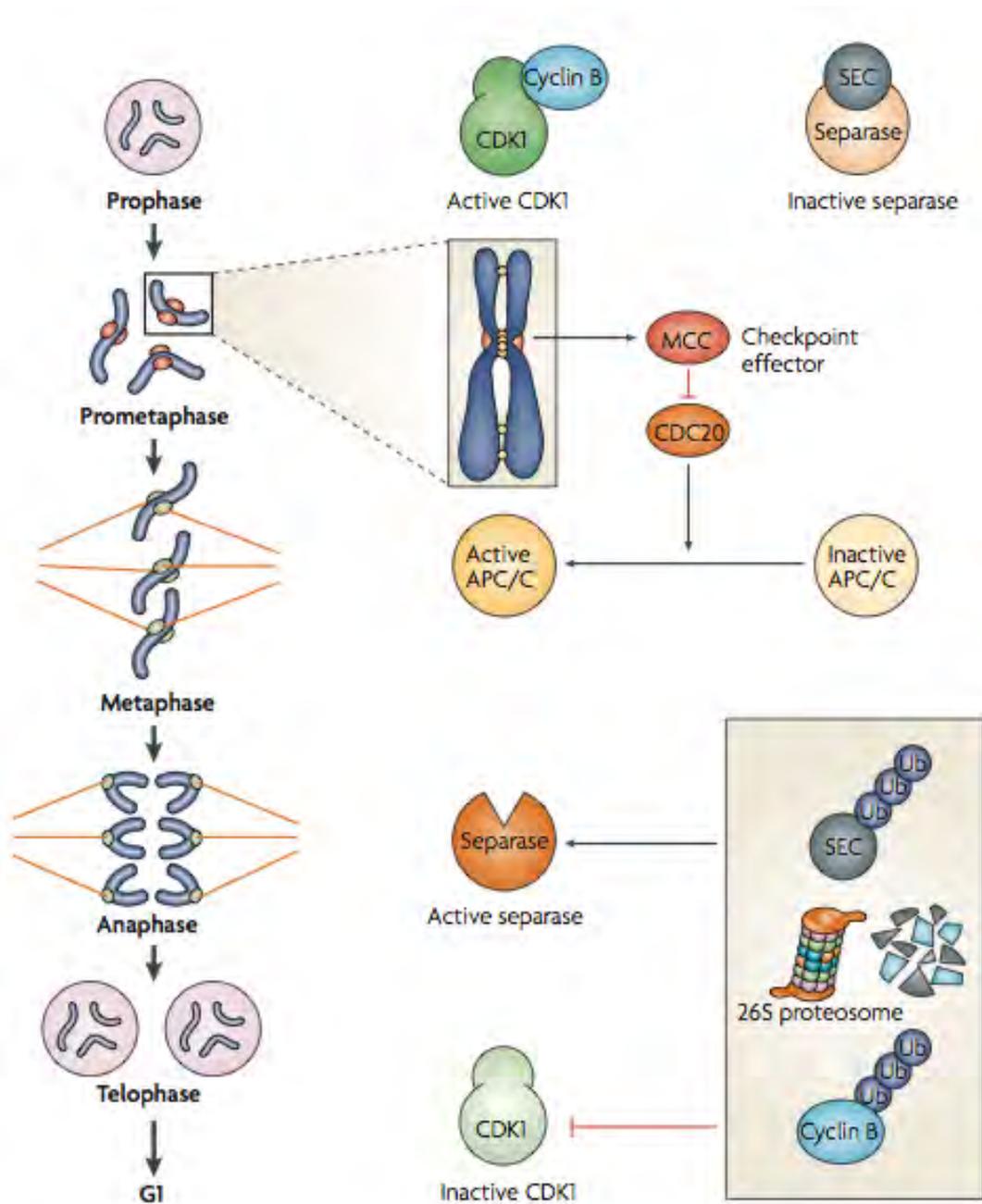


Figure 7. Bases moléculaires du SAC. En début de mitose, le complexe Cdk1/cycline B est actif et phosphoryle activement ses substrats permettant le déroulement des étapes précoces de la division cellulaire. La séparase, enzyme clivant la cohésine qui maintient les chromatides d'un chromosome associée est inhibée par son interaction avec la sécurine. Les kinétochores libres induisent la formation du complexe effecteur du SAC, le complexe MCC, qui inhibe le cofacteur Cdc20 et empêche la protéolyse médiée par le complexe APC/C et le protéasome de facteurs importants pour la progression mitotique comme la cycline B ou la sécurine. Lorsque le SAC est inactivé, l'APC/C^{Cdc20} ubiquitinyne ses substrats, ce qui induit leur prise en charge par le protéasome. La dégradation de la sécurine lève l'inhibition de la séparase permettant le clivage des anneaux de cohésine et la séparation des chromatides sœurs. La dégradation de la cycline B conduit à l'inactivation de Cdk1, requise pour la sortie de la mitose. Tiré de (Musacchio and Salmon, 2007).

3.1.2. Le kinétochore, plateforme du SAC

Au cours de la prométaphase, le fuseau mitotique capture les chromosomes en interagissant avec leurs kinétochores. Ces structures sont organisées de part et d'autre des centromères, sur chaque chromatide. Dans le cœur du kinétochore, on trouve des nucléosomes spécialisés comportant un variant de l'histone 3, la protéine CENP-A qui sont associées à plusieurs CENPs pour former le kinétochore interne (Musacchio and Salmon, 2007). Avant l'entrée en mitose, d'autres protéines fortement conservées au cours de l'évolution comme KNL-1, ou les complexes Mtw1/Mis12, Ndc80/Hec1 et Mcm21 (formant le réseau KMN) sont recrutés à la plaque externe du kinétochore (Musacchio and Salmon, 2007). Ceci constitue une plateforme pour le recrutement des protéines du SAC. Le réseau KMN est directement impliqué dans la liaison avec les microtubules kinétochoriens (Foley and Kapoor, 2013). En périphérie du kinétochore, on trouve une zone appelée la couronne fibreuse dans laquelle viennent se lier divers moteurs protéiques ou effecteurs du SAC (Figure 8) (Musacchio and Salmon, 2007).

Les kinétochores sont les plateformes de signalisation du SAC en mitose. Leur état — libre ou attaché — est crucial pour la régulation de l'activité du point de contrôle. Quand un kinétochore est libre, les protéines du SAC sont recrutées à son niveau et un signal de maintien de son activité est transmis au cytoplasme, notamment par la formation en cascade de complexes MCC. Lorsqu'un kinétochore est capturé de façon stable, les protéines du SAC en sont extraites et il ne soutient plus l'activité du point de contrôle. Du fait de la signalisation en cascade, ce n'est qu'uniquement lorsque tous les kinétochores sont capturés par le fuseau que la signalisation du SAC est éteinte (Musacchio and Salmon, 2007).

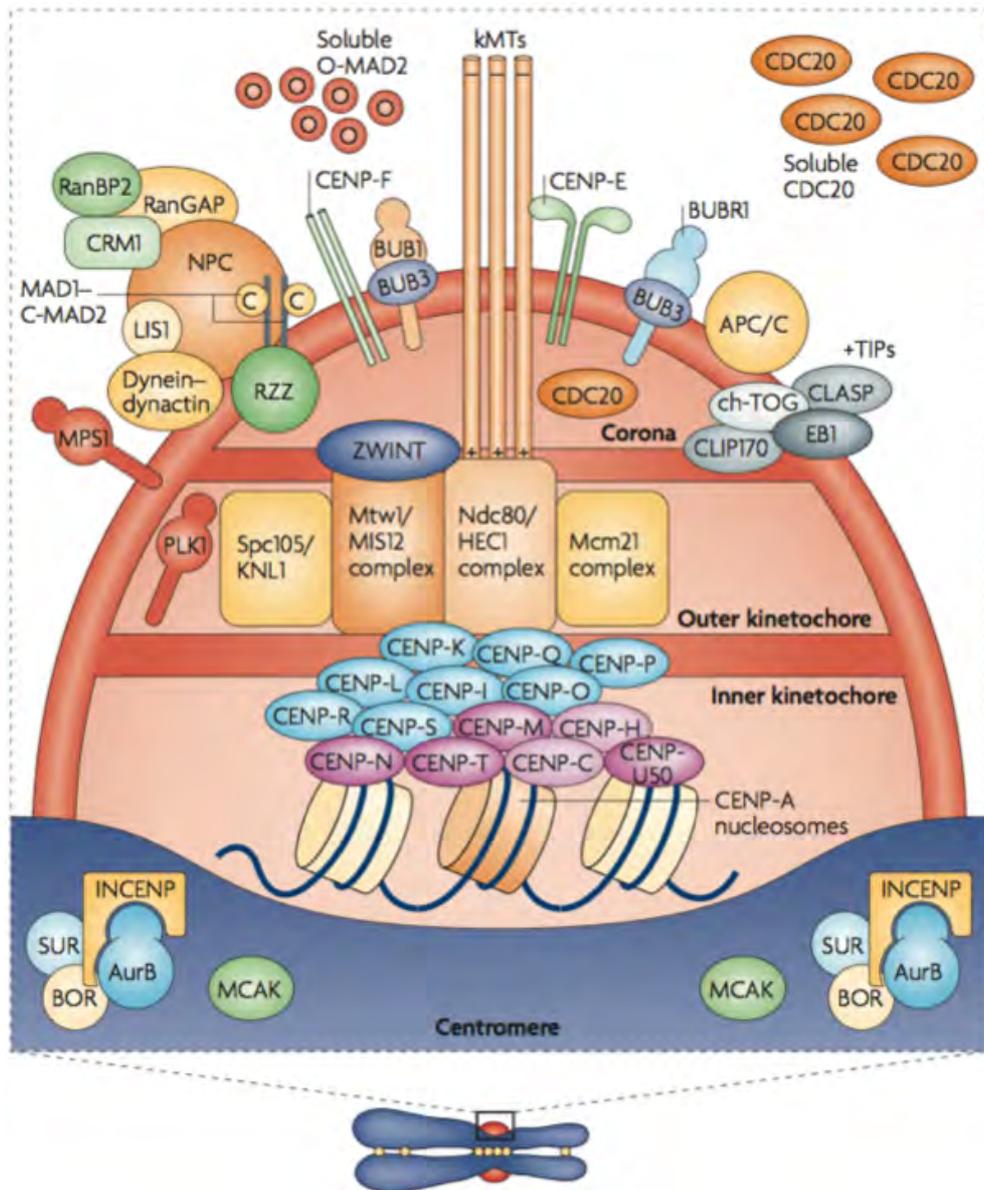


Figure 8. Le kinétochore, plateforme du SAC. Le kinétochore est assemblé en mitose au niveau du centromère. Cette structure complexe et hautement organisée contient de nombreuses protéines impliquées dans la régulation de l'attachement avec les microtubules et la signalisation du SAC. D'après (Musacchio and Salmon, 2007).

3.1.3. Activation du SAC

Au début de la prométophase, tous les kinétochores sont libres : le SAC est donc directement activé dans des cellules en mitose. Récemment, les événements précoces de son activation ont commencé à être déchiffrés.

La formation du complexe MCC est une question non résolue aujourd'hui. Sa purification à partir d'extraits mitotiques de cellules HeLa indique que Mad2, Bub3, BubR1 et Cdc20 sont présentes

dans des proportions stoechiométriques égales. Mad2 et BubR1 se lient à Cdc20 pour bloquer l'activation de l'APC/C. Leurs sites d'interaction sur Cdc20 étant distincts, ils participent de façon synergique à l'inhibition de l'APC/C. Il est possible que la liaison Mad2-Cdc20 serve d'intermédiaire pour promouvoir la formation du MCC. Dans des cellules humaines, l'interaction BubR1-Cdc20 requiert la liaison préalable de Mad2 avec Cdc20 (Davenport et al., 2006). Au moins trois kinases, Bub1, MAPK et Cdk1, phosphorylent Cdc20 pour moduler son interaction avec Mad2 et BubR1.

Récemment, la structure atomique du MCC de *Schizosaccharomyces pombe* a été publiée, révélant les bases moléculaire de sa formation et de l'inhibition de l'APC/C (Chao et al., 2012). Le MCC inhibe l'APC/C en obstruant le site de reconnaissance de Cdc20 et en empêchant son interaction avec la sous-unité Apc10. Mad2 stabilise le MCC en permettant l'interaction entre Mad3 (BubR1 chez l'homme) avec Cdc20. Enfin, d'autres études ont montré que l'incorporation de Cdc20 au MCC stimule son ubiquitylation par l'APC/C et sa dégradation, induisant une inhibition du pool de Cdc20 restant par le SAC.

Dès la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEB), les protéines du SAC sont concentrées aux kinétochores (Cleveland et al., 2003; Maiato et al., 2004). L'existence des kinétochores matures n'est décrite qu'en mitose chez les vertébrés, alors qu'il est proposé que le complexe MCC existe tout au long du cycle cellulaire, posant la question de la contribution du kinétochore dans son assemblage (Sudakin et al., 2001). Le pool de MCC formé indépendamment des kinétochores ne semble pas suffisant pour retarder la ségrégation chromosomique en présence continue de poisons du fuseau mitotique. Cependant, il définit une durée minimale de la prométaphase permettant la maturation complète des kinétochores et le recrutement des protéines du SAC (Meraldi et al., 2004). De façon intéressante, le MCC n'inhibe l'APC/C qu'en mitose, suggérant que les kinétochores libres puissent sensibiliser l'APC/C à cette inhibition (Musacchio and Salmon, 2007). En effet, il existe plusieurs preuves du recrutement de l'APC/C aux kinétochores en présence uniquement d'un SAC actif. Cependant, cette hypothèse n'a pas encore été totalement validée.

La kinase Mps1 joue un rôle prépondérant dans le recrutement des autres protéines du SAC au niveau du kinétochore (Abrieu et al., 2001; Kwiatkowski et al., 2010; Maciejowski et al., 2010; Santaguida et al., 2010). Mps1 phosphoryle KNL-1 au kinétochore, permettant le recrutement de Bub1 et de Bub3, mais également de Mad1 et de BubR1 (London et al., 2012; Rischitor et al., 2007; Shepperd et al., 2012; Vanoosthuyse et al., 2004; Yamagishi et al., 2012). Mps1 permet également le recrutement du complexe RZZ (Rod-Zwilch-ZW10) requis pour recruter Mad1 (Kiyomitsu et al., 2007; Kops et al., 2005).

Un modèle basé sur Mad2 a été proposé pour expliquer la détection de l'état — libre ou attaché — des kinétochores et la signalisation subséquente du SAC. Au niveau du kinétochore, Mad2 existe sous deux formes. Premièrement, Mad2 peut interagir avec Mad1, une protéine requise pour sa localisation kinétochorienne décrite comme un composant stable du kinétochore en prométaphase. Lors de cette interaction, Mad2 adopte une conformation dite « fermée » (C-Mad2). La liaison C-

Mad2-Mad1 agit comme un récepteur pour le recrutement au kinétochore d'une autre forme de Mad2 dite « ouverte » (O-Mad2) (Musacchio and Salmon, 2007). De façon intéressante, les motifs de Cdc20 et de Mad1 impliqués dans la liaison de Mad2 sont similaires. *De facto*, l'interaction Mad2-Cdc20 induit le même changement conformationnel C-Mad2, cette conversion étant facilitée par les complexes stables Mad2-Mad1 établis. Il est ainsi proposé que ces interactions s'amplifient en boucle dans la cellule même à partir d'une faible quantité de C-Mad2-Cdc20 aux kinétochores, soutenant ainsi une activité globale du SAC. Cette hypothèse propose un mécanisme moléculaire à l'observation selon laquelle un seul kinétochore libre suffit à retarder l'entrée en anaphase. Ce modèle prédit que les complexes Mad2-Mad1 n'activent la conformation C-Mad2 qu'en réponse à des kinétochores libres tout comme la formation des complexes C-Mad2-Cdc20. Ainsi, la fonction catalytique de C-Mad2 doit être finement sous le contrôle de l'état du kinétochore (Musacchio and Salmon, 2007).

La protéine p31^{comet}, un interactant de Mad2, fonctionne comme un régulateur négatif du SAC (Habu et al., 2002; Xia et al., 2004). *In vitro*, p31^{comet} se lie avec C-Mad2, prévenant la dimérisation O-Mad2—C-Mad2, alors que son inactivation en périphérie des kinétochores libres la permet.

3.1.4. Régulation de l'interaction microtubules-kinétochore

Progressivement, au cours de la prométaphase, les kinétochores sont capturés par les microtubules kinétochoriens du fuseau mitotique. Il n'est pas compris aujourd'hui s'il existe un signal guidant les microtubules vers les kinétochores ou si les microtubules explorent aléatoirement le cytoplasme pour rencontrer les chromosomes et les capturer. Chez les eucaryotes supérieurs, de nombreux microtubules capturent le même kinétochore. Récemment, les bases moléculaires de cette interaction ont été identifiées.

3.1.4.1. Le réseau KMN et l'interaction avec les microtubules

Le réseau KMN joue un rôle prépondérant dans l'attachement des microtubules au fuseau mitotique. Une étude structurale a montré que Ndc80/Hec1 se lie aux microtubules en interagissant avec l' α - et la β -tubuline (Alushin et al., 2010). De façon surprenante, cette liaison semble permanente tout en préservant la dynamique des microtubules, essentielle au contrôle de la qualité des attachements. Il est proposé que Ndc80 soit capable de se déplacer le long du microtubule lorsqu'il se dépolymérise ; de cette façon, la dépolymérisation n'induit pas de rupture de la liaison Ndc80-microtubule. Ainsi, Ndc80 agirait comme un senseur conformationnel. KNL-1 possède également une activité de liaison avec les microtubules (Cheeseman et al., 2006). Le complexe Mis12, quant à lui, assure l'ancrage du réseau KMN au kinétochore et à l'ADN centromérique *via* une interaction directe avec CENP-C (Petrovic et al., 2010; Przewloka et al., 2011; Screpanti et al., 2011).

3.1.4.2. Stabilisation de l'attachement des microtubules, une histoire sous haute tension ?

Comme nous l'avons vu précédemment, l'attachement des microtubules aux kinétochores s'opère de façon concomitante à l'assemblage du fuseau mitotique. Des attachements anormaux peuvent

être produits (Figure 6). La qualité de la ségrégation des chromosomes requiert la correction de ces erreurs. Ceci implique que l'interaction microtubules-kinétochores soit suffisamment dynamique pour permettre le désassemblage des attachements incorrects. Deux régulateurs cruciaux de ce processus sont la kinase Aurora B et la phosphatase PP2A-B56. Aurora B est associée à l'ADN centromérique et est impliquée dans la déstabilisation des attachements microtubules-kinétochores notamment en phosphorylant les composants du réseau KMN (Lampson et al., 2004; Pinsky et al., 2006; Welburn et al., 2010). Cette phosphorylation réduit l'affinité des kinétochores pour les microtubules (Lampson and Cheeseman, 2011). Aurora B est notamment enrichie au niveau des centromères des chromosomes mal alignés (Salimian et al., 2011). PP2A-B56 contrebalance Aurora B en déphosphorylant ses substrats comme le réseau KMN au niveau du kinétochoire externe (Foley et al., 2011).

Les modèles actuels suggèrent que la régulation de la stabilité des interactions microtubules-kinétochoire repose en partie sur la tension exercée par le fuseau — on parle de tension kinétochorienne (Figure 9) (Liu et al., 2009). L'attachement des microtubules au kinétochoire est désassemblé quand cette tension est faible, alors qu'il est stabilisé lorsqu'elle est forte (Nicklas, 1997; Nicklas et al., 2001). Nous discuterons ici de la théorie la plus récente avancée par Emily Foley et Tarun Kapoor dans la revue *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Foley and Kapoor, 2013). Au niveau des kinétochores libres, Aurora B est proche de ses substrats comme le réseau KMN, et leur phosphorylation est maximale (Welburn et al., 2010). Cette phosphorylation a lieu malgré la présence également de PP2A-B56, sans doute en raison de l'étroite proximité entre Aurora B et ses substrats. Il est également possible que l'activité d'Aurora B supplante alors celle de PP2A-B56. Au cours de la prométaphase, plusieurs kinétochores établissent des liaisons latérales avec les microtubules (Magidson et al., 2011). De façon importante, ces liaisons n'impliquent pas le réseau KMN et produisent une tension kinétochorienne qui étire l'ADN centromérique et éloigne physiquement Aurora B de ses substrats. Cependant, leur proximité avec PP2A-B56 reste constante, la phosphatase étant localisée au niveau du kinétochoire externe (Suijkerbuijk et al., 2012). Ainsi, la phosphorylation du réseau KMN diminue par rapport à un kinétochoire libre de tout microtubule, favorisant la formation d'un attachement non plus latéral mais par l'extrémité des microtubules kinétochoriens (Welburn et al., 2010). On peut imaginer qu'en raison des multiples sites de phosphorylation présents au niveau du réseau KMN, leur déphosphorylation par PP2A-B56 génère une multitude d'états de phosphorylations et induit une évolution graduée des attachements microtubules-kinétochoire, plutôt qu'une alternation binaire. Au fur et à mesure que les microtubules se lient au kinétochoire, la tension kinétochorienne augmente, réduisant l'accessibilité d'Aurora B (Maresca and Salmon, 2009; Uchida et al., 2009). PP2A-B56 est également exclue des kinétochores, alors que la phosphatase PP1 est recrutée, ce qui assure un niveau de phosphorylation faible au niveau des kinétochores capturés par le fuseau mitotique.

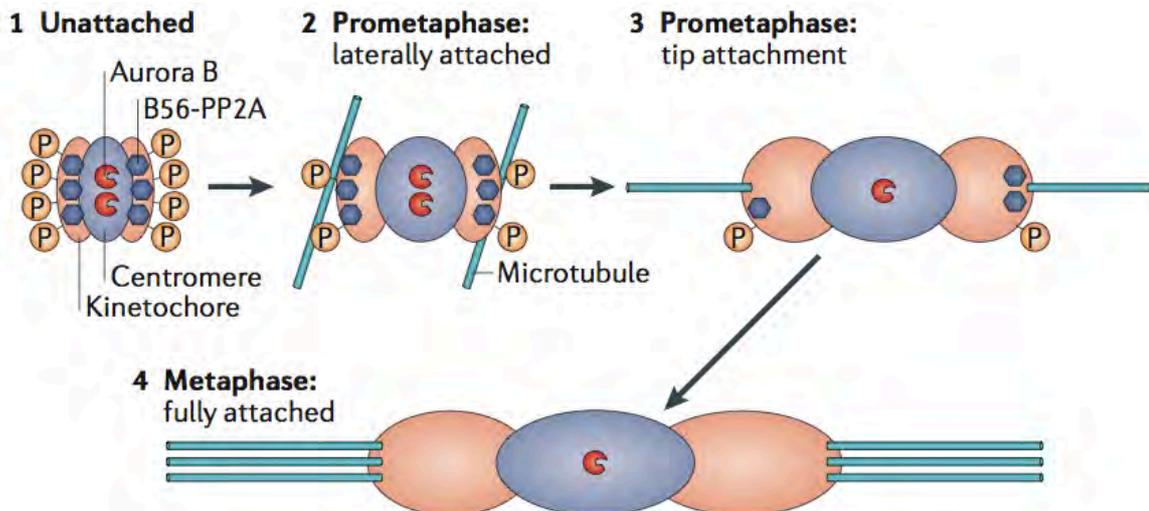


Figure 9. Modèle spéculatif de la régulation de l'attachement kinétochore–microtubule par Aurora B et PP2A-B56. (1) Au niveau des kinétochores libres, l'absence de tension maintient Aurora B à proximité de ses substrats du kinétochore externe et leur phosphorylation est importante. (2) En prometaphase, les interactions latérales entre microtubules et kinétochores génèrent une tension intermédiaire qui étire le kinétochore. Ceci augmente la distance entre Aurora B et ses substrats alors que la localisation de PP2A-B56 reste globalement inchangée. (3) La phosphorylation des substrats d'Aurora B au kinétochore externe diminue, favorisant la stabilisation et le réarrangement de ces attachements. (4) En métaphase, l'occupation par de nombreux microtubules induit la délocalisation de PP2A-B56 du kinétochore. La forte tension exercée étire le kinétochore et le centromère, entraînant une accessibilité réduite à Aurora B, permettant la stabilité des attachements. Tiré de (Foley and Kapoor, 2013).

Une conséquence de ce type de modèle est l'explication du mécanisme de correction des attachements microtubules-kinétochore anormaux par Aurora B. Des attachements monotéliques ou syntéliques n'induisent pas de tension kinétochorienne car un kinétochore est libre (Figure 6) (Foley and Kapoor, 2013; Khodjakov and Pines, 2010; Musacchio and Salmon, 2007). Ainsi, Aurora B reste à proximité de ses substrats, maintenant notamment la phosphorylation du réseau KMN et favorisant la déstabilisation de ces attachements. Un attachement mérotélique induit une tension partielle, contrebalancée par le fait qu'un kinétochore soit capturé par les microtubules établis par les deux pôles du fuseau. Le déplacement du kinétochore externe est alors insuffisant pour le faire sortir du gradient d'activité d'Aurora B et cet attachement est également désassemblé (Foley and Kapoor, 2013; Musacchio and Salmon, 2007). Dans ces trois cas, Aurora B génère des kinétochores libres qui soutiennent l'activité du SAC et qui pourront à nouveau être capturés. A l'inverse, un attachement amphitélique induit un étirement de l'ADN centromérique, un éloignement des deux kinétochores et une forte augmentation de la tension kinétochorienne, sortant le réseau KMN du champ d'action d'Aurora B, ce qui stabilise cette interaction (Foley and Kapoor, 2013; Musacchio and Salmon, 2007). Ainsi, la qualité et la stabilité d'un attachement seraient déterminées indirectement par la tension qu'ils peuvent générer et l'accessibilité résultante à Aurora B et à PP2A-B56. Des attachements

incorrects sont désassemblés, permettant de nouvelles interactions. Ce n'est seulement que lorsqu'un attachement amphitélique est produit qu'il est stabilisé par la tension qu'il génère.

La régulation de l'attachement des microtubules aux kinétochores dépend également d'un réseau de protéines additionnelles comme Plk1 ou les composants du SAC Mps1, BubR1, Bub1 et Bub3 (Lampson and Cheeseman, 2011; Lampson et al., 2004; Maciejowski et al., 2010; Salimian et al., 2011; Santaguida et al., 2010; Suijkerbuijk et al., 2012; Warren et al., 2002). En plus de leur rôle dans l'activation du SAC, ces protéines régulent également Aurora B et PP2A-B56. L'adressage d'Aurora B au centromère dépend en partie de la phosphorylation de l'histone H2A médiée par Bub1 (Kawashima et al., 2010), alors que le recrutement de PP2A-B56 dépend de la phosphorylation de BubR1 par Plk1 (Suijkerbuijk et al., 2012). En retour, PP2A-B56 régule la phosphorylation de BubR1 et l'adressage de Plk1 au kinétochore (Foley et al., 2011). Ces interdépendances de recrutement de kinases et de phosphatases, couplées à un adressage sensible à l'attachement des microtubules permettent des mécanismes rétroactifs rapides en réponse à la liaison microtubules-kinétochore.

La ségrégation correcte des chromosomes ne dépend pas seulement de l'établissement d'attachements corrects des microtubules aux kinétochores. Il est également nécessaire que les kinétochores restent attachés aux microtubules tandis qu'ils subissent des événements de polymérisation et de dépolymérisation. Ndc80/Hec1 est capable de lier le microtubule tout en s'adaptant à sa dynamique (cf. 3.1.4.1). D'autres protéines favorisent cette interaction comme les complexes Dam1 (*Duo1- and Mps1- interacting protein-1*) chez la levure et SKA (*Spindle- and Kinetochore-associated*) chez l'homme. Ces complexes sont notamment régulés négativement par leur phosphorylation par Aurora B (Chan et al., 2012; Gestaut et al., 2008; Lampert et al., 2010; Schmidt et al., 2012; Tien et al., 2010).

Les attachements des microtubules aux kinétochores génèrent des forces qui permettront en anaphase la ségrégation de deux pools de chromatides sœurs, chacun vers un pôle du fuseau. Alors que la cohésion des chromatides est maintenue en prométaphase et en métaphase, ces forces génèrent des tensions au niveau des kinétochores. Nous avons vu que ces tensions peuvent réguler indirectement la stabilité des attachements microtubules-kinétochore en régulant l'accessibilité d'Aurora B et de PP2A-B56 à ses substrats. Cependant, on ne sait pas aujourd'hui si la tension joue un rôle direct dans la modulation de la stabilité des attachements et l'activité du SAC. Cette question est débattue dans la littérature (Musacchio, 2011). La reconstitution *in vitro* de l'attachement microtubules-kinétochores à partir de purifications de levure à bourgeon montre que la tension générée par un attachement bipolaire le stabilise (Akiyoshi et al., 2010).

3.1.5. Inactivation du SAC

Si l'activation et la signalisation du SAC sont des processus essentiels pour la capture de tous les chromosomes par le fuseau mitotique, son inactivation est également importante pour permettre la poursuite de la mitose. La signalisation du SAC depuis les kinétochores dépend de leur état, libre ou

attaché au fuseau. Par exemple, de nombreuses protéines du SAC comme Mad1 et Mad2, enrichies aux kinétochores libres, en sont relarguées par la liaison de microtubules (Musacchio and Salmon, 2007). Les taux kinétochoriens de Mad2 sont notamment fortement réduits en métaphase en comparaison de ceux observés en début de prométaphase au niveau de kinétochores libres. Le relargage des protéines du SAC des kinétochores attachés au fuseau est considérée comme une étape primordiale pour l'extinction du SAC. L'adressage constitutif de Mad1 au kinétochore induit en effet une signalisation du SAC impliquant Mad2 même si les chromosomes sont orientés de façon bipolaire (Maldonado and Kapoor, 2011).

L'extinction du SAC au niveau des kinétochores dépend en partie de l'action de PP1 (Pinsky et al., 2009; Vanoosthuysse and Hardwick, 2009). Le recrutement de PP1 au kinétochore dépend de KNL-1 où il est supposé qu'elle déphosphoryle plusieurs substrats pour inactiver le SAC. La rupture de l'interaction PP1—KNL-1 induit une incapacité à inactiver le SAC dans plusieurs organismes modèles (Espeut et al., 2012; Meadows et al., 2011; Rosenberg et al., 2011).

D'autres mécanismes participent à l'inactivation du SAC. Des dynéines, des moteurs protéiques parcourant les microtubules, sont impliquées dans la déplétion de Mad1 et Mad2, mais également de Mps1, du complexe RZZ et de Spindly (une protéine régulant l'attachement des microtubules) des kinétochores quand ils sont attachés au fuseau (Basto et al., 2004; Gassmann et al., 2010; Hoffman et al., 2001; Howell et al., 2001; King et al., 2000b; Wojcik et al., 2001). La présence de microtubules au niveau du kinétochore inhibe la kinase BubR1 par l'intermédiaire de CENP-E. En réponse à l'attachement, il est imaginable que la régulation de la phosphorylation de ses substrats contribue à l'extinction du SAC.

Enfin, l'inactivation du SAC au niveau des kinétochores comprend la rupture du complexe MCC et la libération de Cdc20, le cofacteur de l'APC/C. L'ubiquitinylation de Cdc20 par l'APC/C favorise son relargage du MCC (Foster and Morgan, 2012; Mansfeld et al., 2011; Uzunova et al., 2012; Varetta et al., 2011). De plus, p31^{comet} favorise la rupture du MCC et l'ubiquitinylation de Cdc20 (Teichner et al., 2011; Varetta et al., 2011; Westhorpe et al., 2011). Sa réactivation en périphérie des kinétochores occupés par des microtubules peut participer à l'inactivation du SAC.

Il est important de déterminer si et comment les kinétochores attachés accélèrent la rupture du complexe MCC, par exemple *via* la régulation de la phosphorylation de ses composants. La contribution des kinases du SAC et des phosphatases présentes aux kinétochores sont des candidats intéressants.

La libération de Cdc20 permet l'activation de l'APC/C et l'ubiquitinylation de ses substrats comme la sécurine ou la cycline B. La dégradation de la sécurine lève l'inhibition de la séparase et induit le clivage de la cohésine. La cohésion entre les chromatides sœurs diminue ainsi. La dégradation de la cycline B contribue à l'inactivation du complexe Cdk1-cycline B, requise également pour l'inactivation du SAC (D'Angiolella et al., 2003; Potapova et al., 2006). Chez la levure, la dégradation

de Mps1 empêche la réactivation du SAC. En effet, la rupture de la cohésion des chromatides sœurs induit une baisse de la tension kinétochorienne et la surexpression de Mps1 est capable de réactiver le SAC (Palframan et al., 2006).

4. Relation entre le SAC et le cancer

4.1. Le SAC prévient la génération d'aneuploïdie

Au cours d'une mitose normale, les deux cellules filles produites sont génétiquement identiques. Le SAC bloque la progression mitotique lorsque tous les chromosomes ne sont pas capturés par le fuseau. Si des attachements microtubules-kinétochore sont anormaux, des mécanismes de correction sont mis en place. Ainsi, l'ensemble de ces mécanismes prévient la mauvaise ségrégation des chromosomes et la génération d'aneuploïdie, c'est-à-dire l'altération du nombre de chromosomes par cellule. De l'aneuploïdie découle une autre notion importante : celle d'instabilité chromosomique. Bien que proches, l'aneuploïdie et l'instabilité chromosomique ne sont toutefois pas des concepts équivalents. Alors que le terme « aneuploïdie » caractérise l'état du caryotype d'une cellule, non-euploïde, l'instabilité chromosomique reflète l'incapacité d'une cellule à maintenir constant le nombre de ses chromosomes au fil des divisions (Potapova et al., 2013; Vitre and Cleveland, 2012).

L'aneuploïdie et l'instabilité chromosomique sont depuis longtemps reconnues comme deux caractéristiques de la majorité des tumeurs humaines (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011; von Hansemann, 1890). Theodor Boveri propose dès 1902 que les cellules primordiales des tumeurs sont aneuploïdes (Boveri, 1902, 1914). Cependant, l'aneuploïdie est-elle une source ou une cause de tumorigenèse ? Cette question reste largement ouverte. En effet, dès ses premières observations, Boveri constate que les embryons d'oursin qu'il tente de rendre aneuploïdes en altérant leurs fuseaux mitotiques meurent. Nous savons aujourd'hui que des forts taux d'aneuploïdie, par exemple le gain ou la perte de plusieurs chromosomes entiers, ne sont pas viables même pour les cellules cancéreuses. Les erreurs massives de ségrégation produites par l'inactivation complète du SAC ou le ciblage du fuseau mitotique induisent la mort cellulaire (Ganem et al., 2009; Kops et al., 2004; Michel et al., 2004b). Inversement, plusieurs études montrent que de faibles taux d'aneuploïdie et d'instabilité chromosomique peuvent favoriser l'initiation et la progression tumorale (Gudimchuk et al., 2013; Putkey et al., 2002; Weaver et al., 2003; Weaver et al., 2007) mais également constituer une source de variation génétique permettant l'adaptation de la tumeur aux différents stress son environnement et à la thérapie (Potapova et al., 2013).

Récemment, dans une étude très élégante, le groupe de Beth Weaver propose que le taux d'erreurs de ségrégation chromosomique prédise si l'aneuploïdie produite va induire ou non des tumeurs (Silk et al., 2013). L'altération de l'expression de certaines protéines du SAC, notamment celle de la protéine CENP-E essentielle à son activité (Abrieu et al., 2000), peut induire de faibles taux

d'aneuploïdie qui favorise l'initiation et la progression tumorale (Gudimchuk et al., 2013; Putkey et al., 2002; Weaver et al., 2003; Weaver et al., 2007). Notamment, les souris *CENP-E^{+/-}* présentent de l'aneuploïdie et de l'instabilité chromosomique *in vivo* et développent plus fréquemment des tumeurs de la rate et du poumon spontanément en vieillissant.

Les nombreuses études analysant les gènes dérégulés dans les tumeurs présentant une instabilité chromosomique ont notamment révélé qu'un grand nombre d'entre eux sont impliqués dans la régulation de la mitose et le SAC (Carter et al., 2006; Kops et al., 2005; Perez de Castro et al., 2007). Ainsi, les gènes codant pour Aurora B, Cdc20, Cdk1, Plk1, la cycline B, la séparase ou encore la sécurine sont trouvés affectés. De plus, des mutations de type perte de fonction sont retrouvées au niveau des gènes *MAD1*, *BUB1* ou encore *BUBR1*. Des souris hétérozygotes pour *Mad2* ou *BubR1* développent des tumeurs spontanées au cours de leur vieillissement (Baker et al., 2004; Michel et al., 2001). L'inactivation de *BUBR1* est notamment associée aux syndromes de séparation prématurée des chromatides et de MVA (*Mosaic Variegated Aneuploidy*). L'inactivation partielle de *BUB1* ou de *BUBR1* conduit chez la souris à une augmentation de la tumorigenèse spontanée, mais également induite par différents carcinogènes (Babu et al., 2003; Baker et al., 2004; Dai et al., 2004; Jeganathan et al., 2007; Perera et al., 2007). L'altération des modifications post-traductionnelles de *BubR1*, comme son acétylation qui régule sa fonction, augmente également la formation de tumeurs spontanées *in vivo* (Park et al., 2013).

4.2. Ciblage du SAC dans la chimiothérapie anti-cancer

La mitose est une cible préférentielle dans la chimiothérapie du cancer. En effet, son ciblage offre diverses possibilités pour tuer les cellules tumorales marquées par une intense prolifération (Manchado et al., 2012). Les poisons des microtubules comme les vinca-alcaloïdes ou les taxanes ont notamment montré une efficacité importante en clinique dans le traitement de nombreux cancers. Les vinca-alcaloïdes comme la vinblastine ou la vincristine déstabilisent les microtubules en bloquant leur polymérisation (Jordan and Wilson, 2004). Ces composés sont notamment efficaces pour le traitement d'un large spectre de cancers hématologiques (Manchado et al., 2012). Les taxanes comme le paclitaxel (taxol) ou le docétaxel favorisent au contraire les microtubules et les stabilisent, bloquant leur dépolymérisation (Jordan and Wilson, 2004). Ils sont notamment utilisés en clinique pour le traitement des cancers du sein, de la prostate, de l'ovaire, certains cancers du poumon et le sarcome de Kaposi (Dumontet and Jordan, 2010; Manchado et al., 2012). Ces deux classes de composés altèrent donc la dynamique des microtubules, bloquant la fonctionnalité du fuseau mitotique et induisent une forte activité du SAC.

En dehors de leur efficacité dans le traitement du cancer, les poisons des microtubules entraînent d'importants effets secondaires. En effet, ces composés ciblent toutes les cellules prolifératives et les patients traités développent notamment des suppressions sévères des cellules myéloïdes due à une altération de la prolifération des cellules de la moelle osseuse (Manchado et al., 2012). De plus,

on constate fréquemment l'apparition de neurotoxicité, les microtubules étant des composants essentiels à la fonction des neurones (Manchado et al., 2012). Enfin, les patients acquièrent également une résistance aux poisons du fuseau (Jordan and Wilson, 2004).

Le SAC retarde l'avènement de la transition métaphase—anaphase tant que les chromosomes ne sont pas correctement attachés au fuseau et alignés pour prévenir des erreurs de ségrégation chromosomique (Musacchio and Salmon, 2007). Ainsi, l'abrogation du SAC résulte dans des erreurs massives de ségrégation et la génération de cellules aneuploïdes comme nous l'avons vu plus haut. Les tumeurs étant caractérisées par de l'aneuploïdie et une instabilité chromosomique, il a été proposé que l'abrogation du SAC puisse potentialiser ces caractéristiques et induire la mort des cellules (Manchado et al., 2012). Contrairement aux autres points de contrôle du cycle, le SAC est essentiel à la survie cellulaire et son ciblage représente un grand intérêt pour tuer les cellules tumorales en induisant une instabilité chromosomique létale (Janssen et al., 2009; Kops et al., 2005; Stolz et al., 2009). L'élimination génétique de *MAD2* ou de *BUBR1* conduisent à de fortes erreurs de ségrégation chromosomique incompatible avec la viabilité cellulaire et déclenchent l'apoptose (Baker et al., 2004; Dai et al., 2004; Dobles et al., 2000; Kops et al., 2004; Michel et al., 2004a; Michel et al., 2001). L'inhibition pharmacologique de Mad2 ou de Mps1 ont été évaluées comme des stratégies anti-tumorales dans des modèles de xénogreffes humaines (Colombo et al., 2010; Kaestner and Bastians, 2010). De plus, l'inhibition de Mps1 sensibilise les cellules au taxol (Janssen et al., 2009). A l'inverse, la régulation négative d'Aurora B constitue un mécanisme d'échappement à ce poison des microtubules (Carmena and Earnshaw, 2003; Nezi and Musacchio, 2009).

En réponse au traitement par des agents anti-mitotiques comme les poisons des microtubules, les cellules sont retardées en prométaphase par l'activité du SAC et peuvent parfois mourir en mitose. Même si le lien entre cet arrêt mitotique et l'apoptose est bien établi, les déterminants moléculaires de cette réponse sont pour la plupart inconnus (Manchado et al., 2012). Pendant longtemps, l'activité du SAC était suspectée comme étant requise pour tuer les cellules traitées par les poisons des microtubules (Tao et al., 2005). Une fonction pro-apoptotique de BubR1 a notamment été démontrée dans des cellules polyploïdes échappant à un arrêt prolongé en mitose (Shin et al., 2003). Cependant, des études ont montré que l'activité du SAC en elle-même n'est pas nécessaire à l'induction de la mort mitotique, démontrant en conséquence qu'un signal pro-apoptotique indépendant du SAC s'accumule pour déclencher la mort durant l'arrêt en mitose (Huang et al., 2009; Manchado et al., 2010).

En réponse aux agents anti-mitotiques, les cellules sont arrêtées pendant de longues durées en mitose. Les cellules peuvent mourir mais également s'échapper de la mitose. Ce phénomène est décrit par le terme anglais « *mitotic slippage* » que nous traduirons par « échappement mitotique » (Brito and Rieder, 2006b). L'échappement mitotique peut être dû à des défauts du SAC, ce qui apporte un bémol aux stratégies visant à inhiber ce point de contrôle pour tuer les cellules tumorales.

Cependant, on constate également un échappement mitotique dans des cellules proficientes pour le SAC en réponse à une dégradation graduée de la cycline B1 (Brito and Rieder, 2006b; Marzo and Naval, 2013). Ceci peut être dû à des défauts de couplage entre l'arrêt mitotique et l'induction de la mort cellulaire.

Suite à leur sortie de mitose, les cellules qui réalisent un échappement mitotique peuvent avoir divers destins (Galan-Malo et al., 2012). Certaines activeront des voies de mort cellulaires et mourront, d'autres entreront en sénescence, mais une partie sera capable de poursuivre sa prolifération et de cycler à nouveau. Une étude très récente menée chez *Drosophila melanogaster* démontre que la combinaison de défauts du SAC et de la machinerie apoptotique conduit à la tumorigenèse (Morais da Silva et al., 2013). Ces résultats peuvent notamment expliquer pourquoi les thérapies anti-mitotiques ne sont pas efficaces dans toutes les tumeurs. De plus, il est également possible, au vu de l'hétérogénéité des cellules constituant une tumeur, que ces agents induisent la sélection de populations déficientes pour le SAC et les mécanismes de mort cellulaire, et la génération de tumeurs secondaires (Marzo and Naval, 2013).

Chapitre 2. La voie sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate

1. Généralités sur le métabolisme sphingolipidique

1.1. Bases structurales des sphingolipides

Les sphingolipides sont une classe de lipides complexes jouant des rôles prépondérants dans la biologie des membranes et la régulation des fonctions cellulaires fondamentales. Leurs premiers représentants ont été identifiés dès 1884 par le biochimiste allemand Johann Ludwig William Thudichum qui, travaillant sur la composition du cerveau, décrivit notamment la sphingomyéline et la sphingosine (Thudichum, 1884). Thudichum choisit le préfixe « *sphingo* » en comparant leurs propriétés énigmatiques aux questions du monstre mythologique grec, le Sphinx. Ce n'est qu'en 1947 que le terme « *sphingolipide* » fut proposé par Herb Carter pour décrire les « *lipides dérivés de la sphingosine* » (Pruett et al., 2008).

Les sphingolipides sont constitués autour d'un squelette commun de type sphingoïde, la sphinganine (ou dihydrosphingosine). Ce squelette résulte de la condensation sur l'acide palmitique (C16) d'une amino-acide sérine (C3), formant une chaîne carbonée linéaire à 18 carbones portant deux fonctions alcools, primaire sur le C1, secondaire sur le C3, et une fonction amine primaire sur le C2 (Figure 10). De cette sphinganine, dérivent tous les autres sphingolipides.

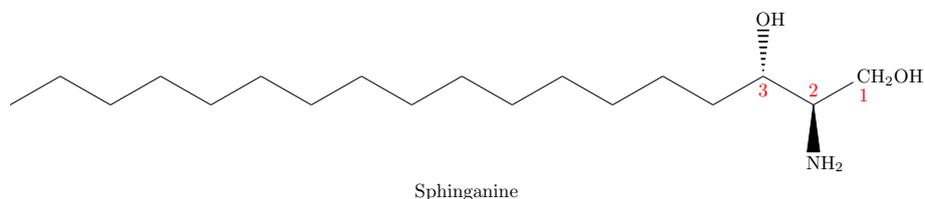
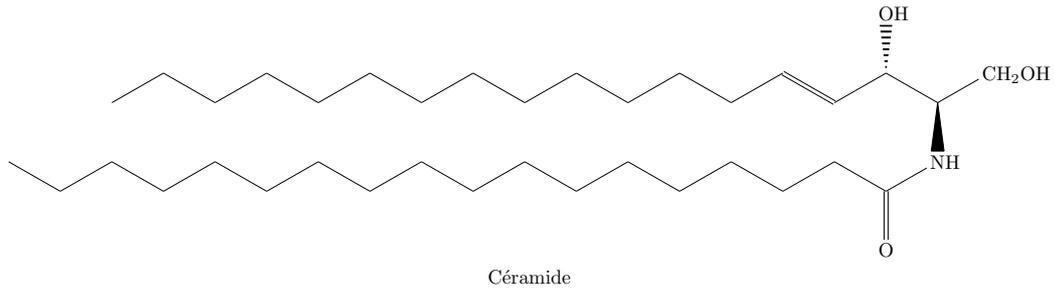


Figure 10. Structure de la sphinganine, squelette commun des sphingolipides.

1.2. Le métabolisme sphingolipidique

Le métabolisme sphingolipidique est un ensemble de réseaux interconnectés divergeant d'un seul point d'entrée dite « la synthèse *de novo* » et convergeant vers un unique point de dégradation. La molécule pivot du métabolisme sphingolipidique est le céramide, un dérivé de la sphinganine en conformation *trans* pour la double liaison C4-C5, et dont la fonction amine (en C2) fixe par acylation un acide gras de longueur variable (de 16 à 24 carbones) (Figure 11). Le céramide peut être synthétisé par plusieurs voies métaboliques distinctes au sein du métabolisme sphingolipidique.

A



B

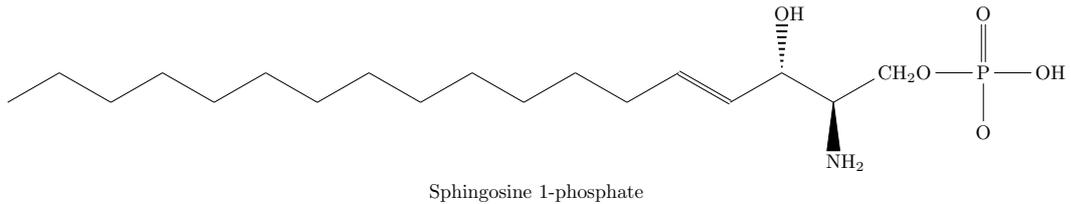


Figure 11. Le céramide et la sphingosine 1-phosphate. (A) Structure du céramide, molécule centrale du métabolisme sphingolipidique. (B) Structure de la sphingosine 1-phosphate, un autre sphingolipide aux fonctions biologiques fondamentales.

1.2.1. La synthèse *de novo*

La synthèse *de novo* des sphingolipides se déroule principalement dans le réticulum endoplasmique (RE), ainsi que probablement au niveau des membranes associées au RE, comme la membrane externe de l'enveloppe nucléaire ou encore les membranes associées aux mitochondries (Hannun and Obeid, 2008). Le point d'entrée dans le métabolisme sphingolipidique est la condensation du palmitate, base conjuguée de l'acide palmitique, et de la sérine en 3-céto-dihydrosphingosine sous l'action de la sérine palmitoyltransférase (SPT). Ce composé est réduit en sphinganine (ou dihydrosphingosine) et peut être ensuite N-acylé par des (dihydro)céramide synthases (CerS) (Hannun and Obeid, 2008; Spiegel and Merrill, 1996). Il existe six CerS chez les mammifères ayant différentes spécificités de substrat vis-à-vis de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras N-acylé¹ (Gault et al., 2010). Le céramide est ensuite formé par la désaturation du dihydrocéramide (formation d'une double liaison en C4-C5).

1.2.2. Autres voies de production du céramide et dérivés

Le céramide est considéré comme la molécule pivot du métabolisme sphingolipidique car il peut être converti en de nombreux dérivés lipidiques généralement plus complexes, et également être produit à partir de ceux-ci (Figure 12). De par sa nature, le céramide possède une très faible solubilité dans l'environnement aqueux et reste généralement confiné aux membranes où il a été produit. Deux

¹ Il existe ainsi plusieurs formes de céramide, différant par la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras N-acylé. Dans ce manuscrit, le terme « céramide » réfèrera globalement à la classe des céramides. Cependant, il convient de garder à l'esprit la complexité des conjugués des céramides comme les sphingomyélines et les glycosphingolipides dont le degré de diversité est tel qu'ils sont considérés comme des classes de molécules à part entière.

mécanismes majeurs permettent le transport du céramide entre le RE et l'appareil de Golgi : la prise en charge par une protéine de transfert, la CERT (*CERamide Transfer protein*) qui adresse le céramide obtenu par la synthèse *de novo* pour former les sphingomyélines ; et le transport vésiculaire plutôt impliqué dans la synthèse des glycosphingolipides.

1.2.2.1. Les sphingomyélines

Les sphingomyélines sont les sphingolipides complexes les plus abondants. Elles dérivent du céramide par le transfert d'un groupement phosphocholine de la phosphatidylcholine par les sphingomyéline synthases (SMS). En catalysant ce transfert, les SMS génèrent également du diacylglycérol (DAG), un important second messager lipidique². Les sphingomyélines formées dans le Golgi sont acheminées à la membrane plasmique par transport vésiculaire (Gault et al., 2010).

Les sphingomyélines peuvent être reconverties en céramide par l'action de plusieurs sphingomyélinases (SMases). Les SMases sont caractérisées par leur localisation cellulaire et le pH optimal pour leur activité. On distingue ainsi les SMases acides (pH acide, au niveau des endosomes et lysosomes, mais pouvant être relocalisées dans le feuillet externe de la membrane plasmique), neutres (feuillet interne de la membrane plasmique) ainsi que des formes plus particulières dites alcalines (Gault et al., 2010; Hannun and Obeid, 2008; Milhas et al., 2010).

1.2.2.2. Les glycosphingolipides

La classe des glycosphingolipides est la plus complexe et la plus diversifiée du monde sphingolipidique. Elle peut être subdivisée en deux groupes, les dérivés du glucosylcéramide et les galactosphingolipides. Le céramide peut être glycosylé dans le feuillet cytosolique du cis-Golgi par la glucosylcéramide synthase (GCS). Le glucosylcéramide est pris en charge par le transporteur lipidique FAPP2 (*Four-Phosphate Adaptor Protein 2*) et acheminé dans les compartiments distaux du Golgi pour permettre la synthèse des glycosphingolipides complexes qui seront adressés à la membrane plasmique par transport vésiculaire (Gault et al., 2010; Hannun and Obeid, 2008).

Le céramide peut également être maturé par la céramide galactosyltransférase (CGT) pour former le galactosylcéramide au niveau du RE. La CGT a une distribution tissulaire limitée, étant principalement détectée dans les cellules de Schwann, les oligodendrocytes, le rein, les testicules et l'intestin. Au niveau du système nerveux central, le galactosylcéramide fournit les précurseurs impliqués dans le processus de myélinisation (Gault et al., 2010).

Des β -glucosidases et des galactosidases spécifiques hydrolysent ces glycosphingolipides pour régénérer le céramide (Gault et al., 2010; Hannun and Obeid, 2008).

² Le céramide et le DAG ont été identifiés comme ayant des propriétés biologiques opposées sur la survie et la prolifération cellulaire, proposant ainsi que les SMS puissent jouer un rôle important dans la régulation de la destinée cellulaire. Cependant, étant donné que les SMS régulent simultanément les niveaux de sphingomyéline, de céramide, de phosphatidylcholine et de DAG, il est difficile d'élucider clairement à ce jour les effets biologiques directs de leurs produits.

1.2.2.3. Le céramide 1-phosphate

Même s'il est métabolisé en sphingolipides plus complexes dans l'appareil de Golgi, le céramide peut également être phosphorylé par la céramide kinase (CerK) en céramide 1-phosphate (C1P). Le C1P peut, en retour, être déphosphorylé par la C1P phosphatase, ou des lipide phosphate phosphatases, pour reformer du céramide (Gault et al., 2010; Hannun and Obeid, 2008).

1.2.2.4. La sphingosine et la sphingosine 1-phosphate, vers la sortie du métabolisme sphingolipidique

Le céramide peut être converti en sphingosine par l'action de céramidases (CDases) qui clivent l'acide gras N-acylé (Cuvillier, 2002; Gault et al., 2010; Hannun and Obeid, 2008). La sphingosine peut être recyclée en céramide par les CerS, ou être phosphorylée par les sphingosine kinases (SphKs) au niveau de sa fonction alcool primaire (Figure 11) pour donner un autre métabolite sphingolipidique, la sphingosine 1-phosphate (S1P) (Gault et al., 2010; Hannun and Obeid, 2008). La S1P peut être déphosphorylée par des S1P phosphatases (S1PPs) dans le RE ou par des lipide phosphate phosphatases en périphérie de la membrane cellulaire (Gault et al., 2010; Hannun and Obeid, 2008). La S1P cytosolique peut également être irréversiblement dégradée par la S1P lyase (SPL) en hexadécénal et phosphoéthanolamine au niveau du RE. La SPL constitue ainsi le seul point de sortie du métabolisme sphingolipidique (Gault et al., 2010; Hannun and Obeid, 2008).

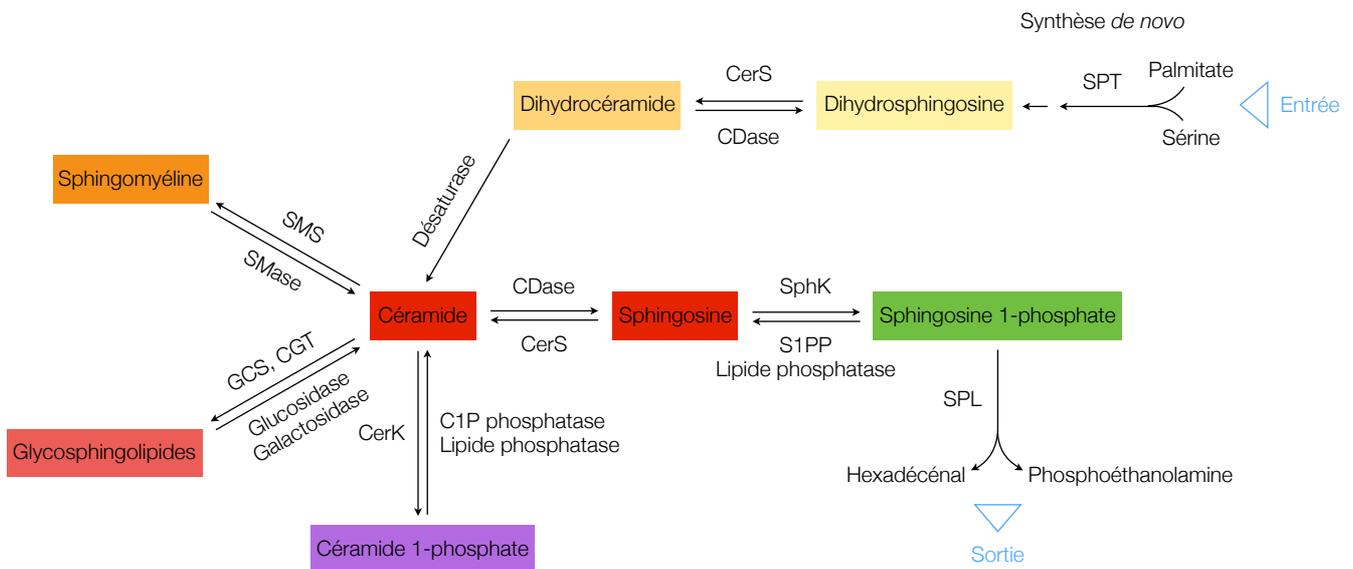


Figure 12. Représentation schématique du métabolisme sphingolipidique. La synthèse *de novo* des sphingolipides à partir de palmitate et de sérine aboutit à la production de céramide, molécule centrale de ce réseau métabolique. Le céramide peut être interconverti en de nombreux dérivés et notamment en sphingosine, phosphorylable par les SphKs pour former la S1P. Adapté de (Hannun and Obeid, 2008).

1.2.3. Notions de « lipide bioactif » et de biostat céramide/S1P

Historiquement, les rôles reconnus des lipides se limitaient exclusivement à la biologie des membranes cellulaires et au métabolisme énergétique. Ces idées préconçues ont retardé l'émergence du concept de « lipide bioactif », c'est-à-dire capable de réguler des fonctions biologiques. Aujourd'hui, il est de plus en plus rare de trouver un domaine de biologie cellulaire dans lequel les lipides ne sont pas d'importantes molécules de signalisation ou de régulation. Ainsi, au cours des vingt dernières années, il a été établi que de nombreux sphingolipides comme le céramide, le C1P, la sphingosine ou encore la S1P sont des régulateurs clés de processus fondamentaux comme la prolifération la survie, le cycle cellulaire, l'apoptose, la migration, la différenciation ou encore la sénescence (Hannun and Obeid, 2008; Maceyka et al., 2012; Spiegel and Milstien, 2003).

Dans la cellule, il existe un équilibre dynamique entre le céramide, la sphingosine et la S1P, régulé par les différentes enzymes qui interconvertissent ces différents métabolites. Le céramide et la sphingosine sont des médiateurs pro-apoptotiques et anti-prolifératifs alors qu'inversement, la S1P stimule entre autres la prolifération cellulaire, la migration et la survie cellulaire. Les travaux originaux d'Olivier Cuvillier *et al.* dans le groupe de Sarah Spiegel sur les effets antagonistes du céramide et de la S1P ont conduit au concept de « biostat céramide/S1P » (ou initialement biostat sphingolipidique) selon lequel la balance entre ces deux sphingolipides est cruciale pour déterminer le devenir cellulaire (Cuvillier et al., 1996) (Figure 13). Les SphKs produisent de la S1P à partir de la sphingosine, réduisant *de facto* la quantité de céramide et favorisent notamment la signalisation de la prolifération et de la survie cellulaire.

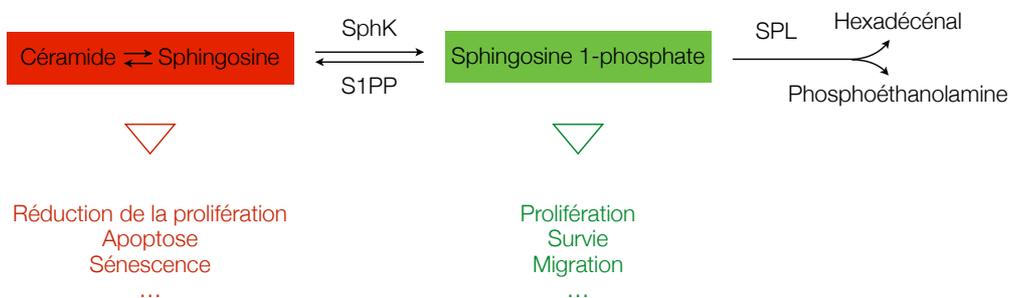


Figure 13. Le biostat céramide/S1P. La balance entre céramide et S1P, sphingolipides aux fonctions opposées, influence le devenir cellulaire. Les SphKs ont une place prépondérante dans la régulation de ce biostat.

Depuis, l'abondante littérature dans cette thématique de recherche a caractérisé le rôle clef des SphKs dans la régulation du biostat céramide/S1P, de ses rôles biologiques et de ses implications physiopathologiques — notamment dans le cancer — que nous détaillerons par la suite.

2. Les sphingosine kinases

Les sphingosine kinases (SphKs) sont des lipide kinases qui catalysent la phosphorylation de la sphingosine en S1P. Ces enzymes ubiquitaires sont fortement conservées au cours de l'évolution puisque des séquences putatives ont été identifiées dans plus de trente espèces réparties dans quatre règnes du vivant. Elles sont notamment retrouvées dans les principaux organismes modèles : les microorganismes unicellulaires comme *Saccharomyces cerevisiae* (Lanterman and Saba, 1998) ou *Dictyostelium discoideum* (Min et al., 2005), les protozoaires tel *Caenorhabditis elegans* (Kohama et al., 1998), les insectes avec *Drosophila melanogaster* (Herr et al., 2004), et chez les végétaux comme *Arabidopsis thaliana* (Nishiura et al., 2000). Deux gènes, *LCB4* et *LCB5*, codant pour des enzymes à activité sphingosine kinase ont été identifiés chez *Saccharomyces cerevisiae* (Nagiec et al., 1998). L'identification de nombreux homologues ont démontré l'existence d'une famille de gènes très conservés codant pour les SphKs.

Chez les mammifères, une activité sphingosine kinase a été décrite pour la première fois au début des années 1970 dans le foie de rat (Keenan and Maxam, 1969), le cerveau de bœuf (Louie et al., 1976), et les plaquettes humaines (Stoffel et al., 1973). Cette activité sphingosine kinase est assurée chez les mammifères par deux isoenzymes, les sphingosine kinases 1 (SphK1) et 2 (SphK2)³. La SphK1 a été clonée et purifiée pour la première fois par le groupe de Sarah Spiegel, à partir de rein de rat (Olivera et al., 1998) puis chez la souris (Kohama et al., 1998). La forme humaine de la SphK1 fut identifiée en 2000 par homologie de séquence avec l'enzyme murine (Nava et al., 2000). La même année, l'équipe de Sarah Spiegel réussit à cloner la SphK2 murine et humaine (Liu et al., 2000).

L'analyse par Northern blot de l'expression de l'ARN messager des SphKs indique qu'elles ont des distributions tissulaires différentes. La SphK1 est fortement exprimée dans le poumon, la rate, le cœur, le thymus, le cerveau, le rein et les testicules (Melendez et al., 2000), alors que la SphK2 est prédominante dans le foie, le cœur et les reins (Liu et al., 2000). Au cours du développement embryonnaire murin, le pic d'expression de la SphK1 se situe aux stades E7-E11, alors que la SphK2 est exprimée plus tardivement (E15-E17)(Liu et al., 2000).

2.1. Propriétés structurales

2.1.1. Variants d'épissage de la SphK1

Chez l'homme, le gène *SPHK1* est porté par le chromosome 17 (locus 17q25.2). Il code pour plusieurs isoformes de la SphK1 générées par épissage alternatif, nommées SphK1a (RefSeq NM_001142601), SphK1b (RefSeq NM_021972) et SphK1c (RefSeq NM_182965) (Billich et al., 2003). Le variant majoritaire serait l'isoforme SphK1a (Venkataraman et al., 2006) d'une longueur de 384 acides aminés (~42,5 kDa). Les variants SphK1b et SphK1c diffèrent de la SphK1a par l'ajout de 14

³ A ce jour, seulement deux formes de SphKs ont été clonées chez les mammifères. Cependant, certaines études datant des années 2000 suggèreraient l'existence de SphKs additionnelles, bien qu'aucune d'elles n'ait été décrite depuis (Taha et al., 2006).

et 86 acides aminés respectivement dans la partie N-terminale de la protéine (Billich et al., 2003) (Figure 14). Leurs propriétés enzymatiques étant très proches, pour la suite du manuscrit, le terme « SphK1 » englobera les trois isoformes. Les positions numérotées des résidus se référeront à la séquence protéique de la forme humaine de la SphK1a (GenBank AAH08040).

2.1.2. Variants d'épissage de la SphK2

Le gène *SPHK2* se situe sur le chromosome 19 (19q13.33). Il code pour deux variants d'épissage⁴, nommés SphK2a (ou SphK2-S, numéro d'accès AF245447), forme initialement rapportée (Liu et al., 2000), et SphK2b (ou SphK2-L, RefSeq NM_020126) qui semble être la forme majoritaire chez l'homme (654 acides aminés pour un poids moléculaire estimé à ~69,2 kDa) (Alemany et al., 2007; Okada et al., 2005) (Figure 14). De même que pour la SphK1, toutes les isoformes seront indistinctement regroupées sous le terme « SphK2 » pour la suite. La numérotation des résidus sera donnée en référence à la séquence protéique de la forme humaine de la SphK2 (GenBank AAF74124).

2.1.3. Cinq domaines fonctionnels hautement conservés au cours de l'évolution

Malgré la différence substantielle de taille entre les deux isoenzymes, elles partagent un fort degré de similarité (47% d'identité pour la partie N-terminale, 43% pour la C-terminale) (Figure 14). La SphK2 possède une partie N-terminale plus longue ainsi qu'une insertion polypeptidique riche en proline dans sa région centrale, la distinguant de la SphK1. L'analyse des séquences des SphKs a permis d'identifier cinq domaines conservés au cours de l'évolution notés C1 à C5 (Kohama et al., 1998; Pitson, 2011). Cependant, les SphKs ne partagent de séquence homologue avec d'autres lipide kinases comme la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K). Les domaines C1 à C3 (C1–C3) et C5 présentent une relative homologie avec la diacylglycérol kinase (DGK) et la CerK, le domaine C4 étant plus spécifique des SphKs (Spiegel and Milstien, 2003; Taha et al., 2006). Les domaines C1–C3 des SphKs possèdent le site catalytique, le site de liaison de l'ATP étant présent sur le domaine C2 dans la séquence consensus $\text{SGDGx}_{(17-21)}\text{K}$ (Pitson et al., 2002). La mutation G82D en aval de l'acide aspartique a été décrite comme créant un mutant catalytiquement inactif de la SphK1 (Pitson et al., 2000b). Le site de liaison de la sphingosine implique le résidu D178 (D177 chez la souris) conservé au sein de la séquence DVDLE dans le domaine C4 de la SphK1 (Yokota et al., 2004). Cet acide aspartique, chargé négativement, pourrait interagir avec la charge positive du groupement amine de la sphingosine, ou être impliqué dans une liaison hydrogène avec le groupement hydroxyle. Les mutants murins de la SphK1 D177N, D175N/D177N ou encore D177N/E179Q perdent en quasi-totalité leur activité sphingosine kinase, leur affinité pour la sphingosine étant considérablement réduite ($K_m(\text{mSphK1}^{\text{WT}}) = 10,1 \mu\text{M}$; $K_m(\text{mSphK1}^{\text{D177N}}) = 108 \mu\text{M}$) (Yokota et al., 2004).

⁴ Un troisième variant d'épissage de la SphK2 a été rapporté (SphK2c, GenBank EF107108) sous la forme d'un ARNm dans quelques lignées humaines (Alemany et al., 2007). Des analyses *in silico* ont prédit une quatrième isoforme de la SphK2 (GenBank AK000599) mais son expression n'a pas été encore étudiée. Elle ne posséderait pas les domaines C4–5, ce qui exclurait qu'elle possède une activité sphingosine kinase (Neubauer and Pitson, 2013).

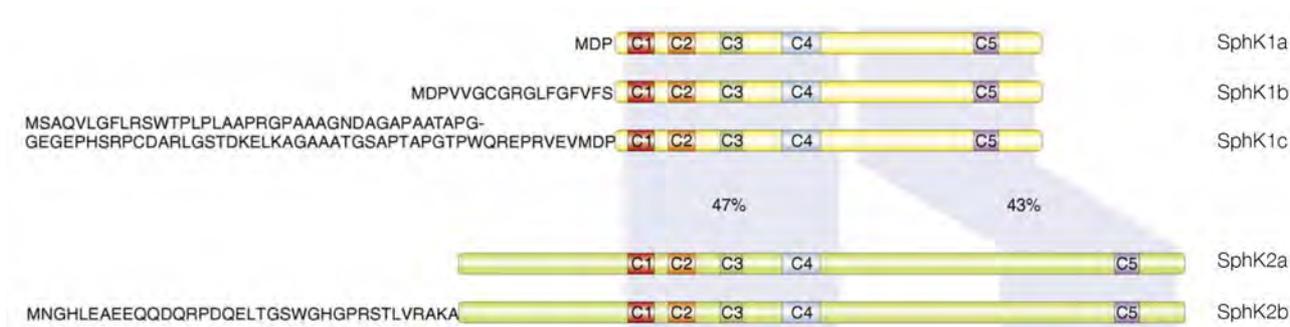


Figure 14. Variants de la SphK1 et de la SphK2. Les SphKs partagent cinq domaines fonctionnels de forte similarité identifiés C1—C5, malgré la grande différence de taille entre les deux protéines. Les variants des SphKs diffèrent par leur partie N-terminale. D'après (Pitson, 2011)

2.1.4. Autres séquences remarquables

2.1.4.1. La SphK1

La SphK1 contient dans les 17 derniers résidus de sa partie C-terminale une région riche en proline, apparenté au domaine d'interaction protéine-protéine de type SH3 (*Src Homology 3*) (Ren et al., 1993; Taha et al., 2006; Yu et al., 1994). La séquence de la SphK1 comporte également deux séquences d'export nucléaire (NES) qui permettent de relocaliser l'enzyme du noyau au cytoplasme. La NES1 est contenue dans les résidus 147-155 tandis que la NES2 est comprise entre les acides aminés 161-169 (Inagaki et al., 2003). Le motif P³⁷⁹PEE³⁸² permet l'interaction de la SphK1 avec la protéine TRAF2 (*Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 2*) (Xia et al., 2002).

Quatre motifs de liaison calcium/calmoduline ont été rapportés dans la séquence de la SphK1, deux se chevauchant entre les résidus 134-153, un autre en position 101-206, et un dernier dans la partie C-terminale en 290-303 (Kohama et al., 1998; Pitson et al., 2000a; Sutherland et al., 2006).

La SphK1 possède également de nombreux sites putatifs de modifications post-traductionnelles. On retrouve notamment plusieurs sites de phosphorylation potentielle par la protéine kinase C (PKC) (T54, S181, T205, S371) ou la caséine kinase II (T130) (Pitson et al., 2000a). La S225 est un site de phosphorylation par Erk1/2 (*Extracellular signal-regulated kinases 1/2*) crucial pour l'activation de la SphK1 (Pitson et al., 2003). Plusieurs sites putatifs de N-myristoylation (résidus 5-10, 111-116, 113-118, 293-298) ou de N-glycosylation (N137) ont été identifiés (Taha et al., 2006) (Figure 15).

Récemment, la structure atomique de la SphK1 a été décrite, apportant des précisions sur l'interaction SphK1—sphingosine et la catalyse de la phosphorylation de la S1P (Wang et al., 2013). Cette structure a été obtenue à partir d'une cristallisation des résidus 9-364 de la SphK1 (la forme totale de 384 acides aminés ne produisant pas de cristaux), avec une résolution de 2 Å. La SphK1 adopte une architecture en deux domaines similaire à celle des NAD⁺ kinases ou de la DGK, membres de la superfamille des kinases semblables à la phosphofruktokinase. La cavité de liaison aux lipides serait un tunnel hydrophobe en forme de J entre les domaines N- et C-terminaux de la SphK1 (Figure 16). La partie 2-amino-1,3-diol de la tête polaire de la sphingosine se disposerait à cet

interface, créant des liaisons hydrogène avec le D81 de la boucle β 3- α 3 (résidus S79-G82), la S168 et le D178. La longue chaîne carbonée serait enfouie dans le tunnel hydrophobe en J dont la conformation assurerait la spécificité de substrat de l'enzyme. Les hélices α 7- α 8 du domaine C4 agiraient comme une porte pouvant s'ouvrir et se fermer pour rendre accessible la cavité aux substrats lipidiques et le relargage des produits. Dans la conformation liée à la sphingosine de l'enzyme, la fermeture de cette porte permettrait au résidu D178 de l'hélice α 8 de stabiliser l'interaction SphK1—sphingosine en créant une liaison hydrogène avec le groupement 4-hydroxyle de la sphingosine. Ces données vont dans le sens de précédentes études biochimiques soulignant le rôle de ce résidu dans l'interaction avec la sphingosine (Yokota et al., 2004) (cf. 2.1.3).

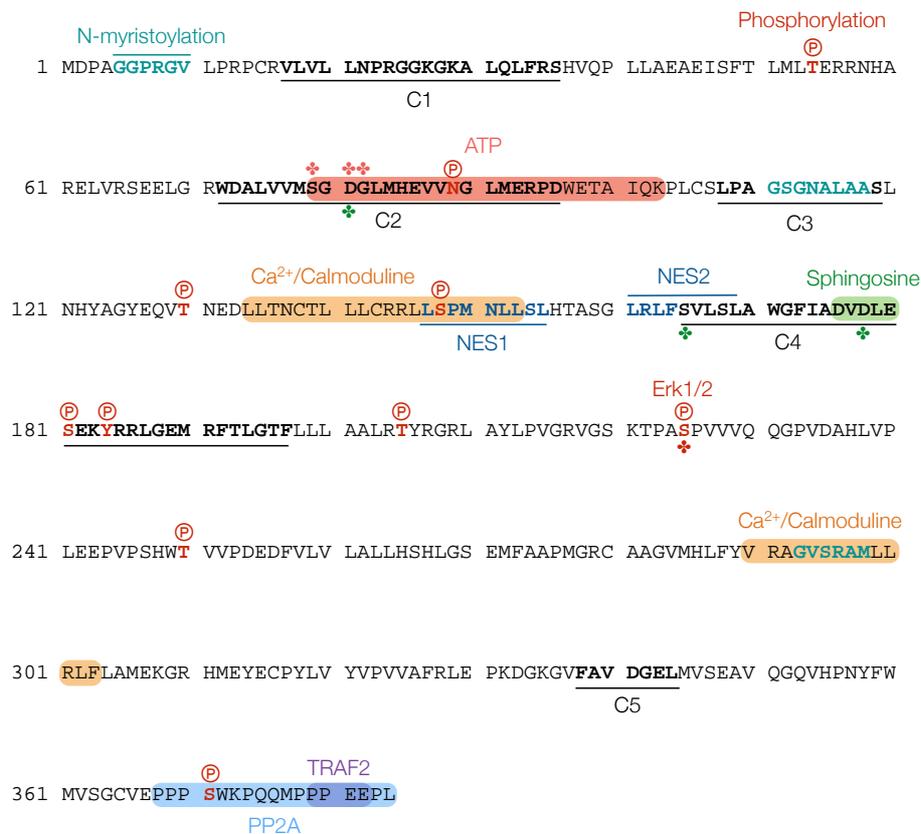


Figure 15. Séquence peptidique de la SphK1. Les domaines fonctionnels C1—5 sont indiqués en noir. Les sites d'interaction avec l'ATP, la sphingosine ou des protéines régulatrices sont indiqués en surligné et les résidus importants pour ces interactions sont représentés par le symbole ✦ avec le code couleur correspondant. Les principales modifications post-traductionnelles de la SphK1 sont également mentionnées.

La co-cristallisation de la SphK1 avec le SKI-II (SKi) a permis de valider que ce composé est un inhibiteur compétiteur du site de fixation de la sphingosine et non de l'ATP comme l'indiquaient de précédentes études biochimiques (French et al., 2003). Notamment, le groupement phénol du SKi compète directement avec la sphingosine pour l'établissement de la liaison hydrogène avec le D178.

Par ailleurs, la co-cristallisation de la SphK1 avec l'ADP a permis d'élucider le site de liaison du nucléotide et sa contribution au fonctionnement du site catalytique de la SphK1. Le modèle établi par Wang *et al.* prédit que le groupement polaire de la sphingosine est fortement proche du groupement phosphate β de l'ADP (~ 6 Å). La modélisation d'un ATP en lieu et place de l'ADP sur ce site propose que le groupement 1-hydroxyle de la sphingosine soit environ à 2,5 Å de l'atome d'oxygène du groupement γ de l'ATP, et dans une configuration favorable pour une attaque nucléophile et un transfert du groupe phosphoryle. De plus, le résidu N81 agirait comme catalyseur de ce transfert, en déprotonant le groupement 1-hydroxyle de la sphingosine et en augmentant ainsi sa nucléophilicité pour le groupement γ de l'ATP. Le mutant D81A de la SphK1 ne possède pas d'activité de transfert de groupement phosphoryle (Wang *et al.*, 2013).

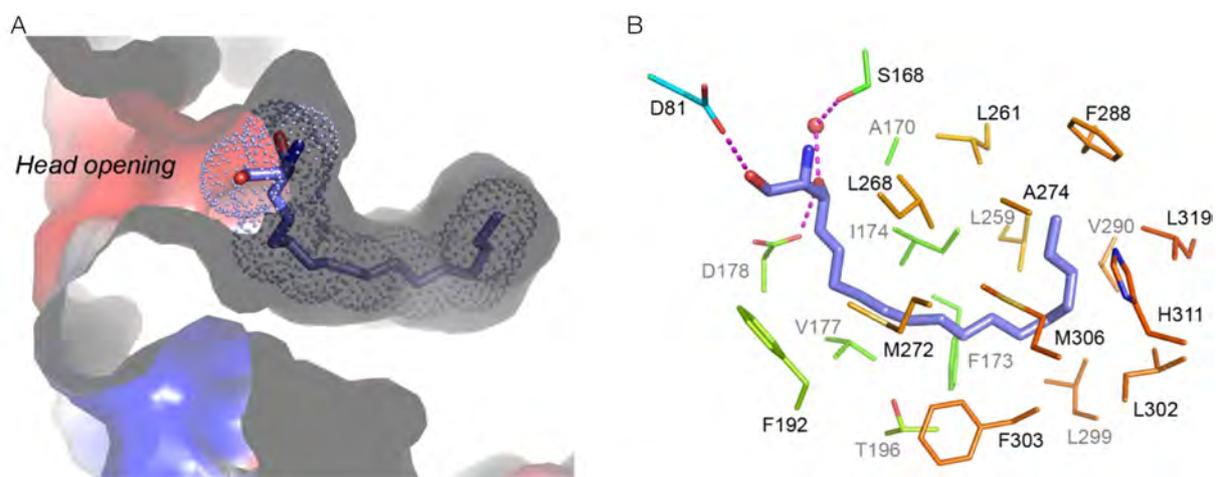


Figure 16. Détail du site de liaison de la sphingosine sur la SphK1. (A) La sphingosine s'insère dans un tunnel hydrophobe en forme de J situé dans l'espace entre les deux domaines N- et C-terminaux. Ainsi, elle apparaît complètement enfouie dans la SphK1, seule la tête polaire émergeant en regard des résidus stabilisant la liaison. (B) Détail des interactions lipide-protéines entre la sphingosine et la SphK1. Les résidus D81, S168 et D178 sont directement impliqués dans des liaisons hydrogènes avec la sphingosine. Les liaisons hydrogènes sont représentées par les lignes magenta en pointillées, les molécules d'eau par des sphères rouges. D'après (Wang *et al.*, 2013)

Ces données soulignent le rôle crucial la séquence $S^{79}GDG^{82}$ dans l'activité SphK1 ; elle agirait à la fois comme site de liaison du nucléotide et du substrat lipidique, le résidu D81 servant de base catalytique à la catalyse de l'ATP. Les acides aminés S79 et G82 seraient également impliqués par des liaisons hydrogènes dans l'interaction avec le nucléotide, ce qui justifierait les précédentes observations biochimiques (Pitson *et al.*, 2002).

La publication de la structure de la SphK1 fournit de meilleures explications de la fonction catalytique de la protéine, permettant de visualiser les interactions atomiques entre enzyme et substrat. Cependant, elle soulève également des questions fondamentales quant à la biologie des SphKs. Par exemple, l'entrée de la sphingosine par sa queue aliphatique, dépourvue de signaux distinctifs des autres sphingolipides, dans le tunnel hydrophobe du site catalytique implique une

relation enzyme-substrat particulière. La sphingosine est majoritairement ancrée dans les membranes biologiques par sa queue hydrophobe, seule sa tête polaire étant exposée. Ainsi, comment la SphK1 reconnaît-elle son substrat ? Une hypothèse serait que la SphK1 reconnaisse la tête polaire de la sphingosine et parvienne à l'extraire de la membrane biologique par un mécanisme inconnu à ce jour (Lima and Spiegel, 2013).

2.1.4.2. La SphK2

En plus des cinq domaines C1–C5, la SphK2 possède quatre régions transmembranaires putatives (Spiegel and Milstien, 2003). De façon similaire à la SphK1, la SphK2 contient un domaine riche en proline (résidus 344-493) (Taha et al., 2006). Une séquence de localisation nucléaire (NLS) a été décrite dans la partie N-terminale, ainsi qu'une NES dans la partie centrale de la protéine (Igarashi et al., 2003; Neubauer and Pitson, 2013). La SphK2 possède une séquence de neuf acides aminés similaire aux motifs retrouvés dans la famille des protéines pro-apoptotiques « BH3-only » (*Bcl2 Homology domain 3*), ce qui permettrait son interaction avec Bcl-x_L (*B-cell lymphoma extra large*) (Liu et al., 2003) (Figure 17).

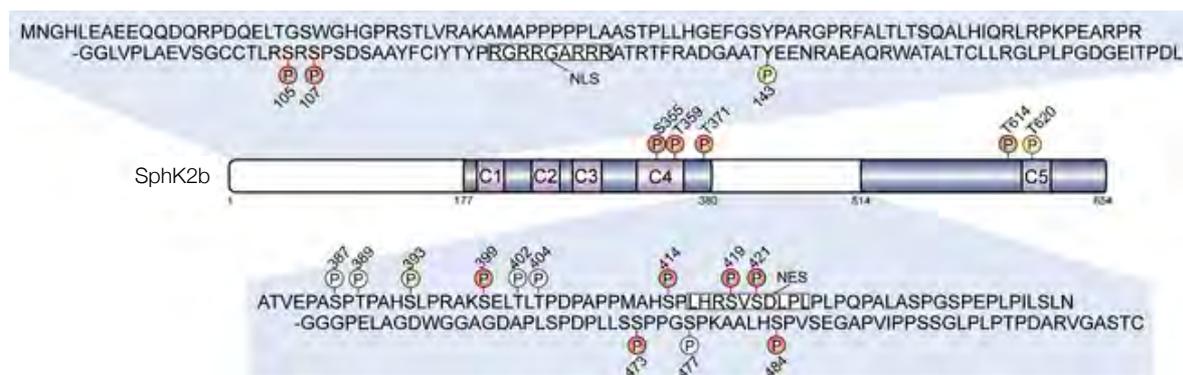


Figure 17. Domaines régulateurs et modifications post-traductionnelles de la SphK2. Les régions en blanc indiquent des séquences riches en proline. Les régions en bleu représentent les séquences fortement similaires à la SphK1, incluant les cinq domaines fonctionnels C1–5. La NLS est en position N-terminale, la NES en C-terminale. L'isoforme SphK2b ici schématisée possède trente-six acides aminés supplémentaires en position N-terminale par rapport à la SphK2a. De nombreux sites de phosphorylation ont été identifiés (en rouge et jaune les sites conservés entre les formes murine et humaine, en blanc les sites non conservés). D'après Neubauer and Pitson, 2013.

La SphK2 comporte de nombreux sites putatifs de phosphorylation par la PKC (T66, T98, T184, S311, S319, T335, S441, T578), la caséine kinase II (S71, T106, S198, S200, S305, S383) ou les protéines kinases A et G (résidus 93-96). Les kinases Erk1/2 peuvent phosphoryler la SphK2 sur les résidus S351 et T578 (S387 et T614 pour la SphK2b) (Hait et al., 2007). Des sites de phosphorylation (positions 70-78) ou de sulfatation (100-114) de tyrosine ont été prédits. On retrouve également un site potentiel d'amidation (résidus 86-89). Plusieurs sites putatifs de N-myristoylation (acides aminés 20-25, 176-181, 196-201, 236-241, 241-246, 243-248, 325-330, 440-445, 473-478, 538-543, 554-559, 604-609) ou de N-glycosylation (N137) ont également été identifiés (Taha et al., 2006). Un

domaine de liaison aux lipides a été caractérisé dans la partie N-terminale de la protéine (Don and Rosen, 2009) (Figure 17).

2.2. Propriétés biochimiques

2.2.1. La SphK1

La purification et le clonage de la forme humaine de la SphK1 ont permis d'établir les substrats préférentiels ainsi que les conditions optimales pour son activité catalytique. La SphK1 peut phosphoryler la *D-erythro*-sphingosine (communément appelée sphingosine ; $K_m=15,6 \mu\text{M}$), et la *D-erythro*-dihydrosphingosine (ou sphinganine ; $K_m= 20 \mu\text{M}$) (Billich et al., 2003; Pitson et al., 2000a). En revanche, aucune activité kinase de la SphK1 n'est détectée en présence de phytosphingosine (forme végétale de la sphingosine), de *N,N,N*-triméthylsphingosine, de C2-céramide (*N*-acetylsphingosine), de DAG ou de phosphatidylinositol (Pitson et al., 2000a). La *D,L-threo*-dihydrosphingosine (DHS, $K_i= 5,9 \mu\text{M}$) et la *N,N*-diméthylsphingosine (DMS, $K_i= 7,8 \mu\text{M}$) sont des inhibiteurs compétitifs de la SphK1 (Buehrer and Bell, 1992; Pitson et al., 2000a; Yatomi et al., 1996).

L'activité enzymatique de la SphK1 est maximale à pH 7,4 à 37°C. Elle requiert également la présence d'ions Mg^{2+} mais diminue en présence d'ions Ca^{2+} ou Mn^{2+} et est complètement abolie par la présence d'ions Zn^{2+} , Cu^{2+} ou Fe^{2+} (Pitson et al., 2000a). La SphK1 est également sensible à la concentrations en sels : une augmentation de NaCl ou de KCl inhibe fortement son activité enzymatique. Enfin, la SphK1 est stimulée par l'ajout de Triton X-100 dans le milieu réactionnel⁵ (Liu et al., 2000).

2.2.2. La SphK2

La SphK2 possède un plus large spectre de substrats que la SphK1 (Pitman and Pitson, 2010). Elle peut phosphoryler la *D-erythro*-sphingosine ($K_m= 13,8 \mu\text{M}$) et la *D-erythro*-dihydrosphingosine, mais également la phytosphingosine, la DHS et l'analogue immunomodulateur de la sphingosine, le FTY720 (Fingolimod)⁶ (Billich et al., 2003; Liu et al., 2000; Sanchez et al., 2003). En revanche, de façon similaire à la SphK1, la SphK2 n'est pas capable de phosphoryler le C2-céramide, le diacylglycérol ou le phosphatidylinositol. La DMS est décrite comme un inhibiteur non compétitif de la SphK2 ($K_i= 12 \mu\text{M}$). A l'inverse de la SphK1, l'activité SphK2 est nettement stimulée par une concentration croissante en sels (NaCl, KCl) ; par contre, elle est inhibée par des doses croissantes de Triton X-100 et d'albumine sérique bovine (BSA)⁵ (Liu et al., 2000).

2.3. Propriétés biologiques

Les *knock-out* (KO) murins des SphKs réalisés indiquent que les souris *SPHK1*^{-/-} ou *SPHK2*^{-/-} naissent et vivent sans anomalie phénotypique apparente, tandis que le double KO *SPHK1*^{-/-} /

⁵ Le test enzymatique permettant de doser l'activité sphingosine kinase utilise ces propriétés pour discriminer l'activité spécifique de la SphK1 ou de la SphK2 (cf. section Matériel et méthodes).

⁶ La SphK1 est également capable de phosphoryler le FTY720 *in vitro* ; cependant, sa contribution à la génération de FTY720-P *in vivo* est considérée comme négligeable (Kharel et al., 2005).

SPHK2^{-/-} est létal durant le développement embryonnaire (E13,5) en raison d'une maturation incomplète des systèmes cardiovasculaire et nerveux central (Allende et al., 2004; Liu et al., 2000; Mizugishi et al., 2005). Ces données suggèrent donc que les SphKs possèdent des fonctions redondantes, l'une pouvant compenser la déficience de l'autre.

La SphK1 est largement décrite comme une enzyme pro-proliférative et anti-apoptotique, augmentant les taux de S1P et diminuant ceux de céramide. Il est notamment bien décrit que la surexpression de la SphK1 confère une résistance à l'apoptose induite par le céramide lui-même, Fas ou encore la privation en sérum (Maceyka et al., 2002). Cet effet anti-apoptotique peut être reproduit par la stimulation par la S1P, indiquant que la SphK1 protège de l'apoptose *via* la production de S1P (Edsall et al., 1997).

Les rôles de la SphK2 paraissent plus ambigus. Des études rapportent que sa déplétion induit un arrêt de la prolifération de plusieurs lignées cancéreuses (Gao and Smith, 2011; Van Brocklyn et al., 2005). Elle est également impliquée dans la résistance à l'apoptose induite par la doxorubicine impliquant l'inhibiteur de Cdks p21 (Sankala et al., 2007). Cependant, de nombreuses preuves indiquent que la SphK2 a également des fonctions pro-apoptotiques. Elle possède une séquence similaire au domaine BH3 de la famille des protéines pro-apoptotiques « BH3-only » (Liu et al., 2003). Il a notamment été décrit que la surexpression de la SphK2 induit l'apoptose suite à la privation en sérum (Liu et al., 2003; Maceyka et al., 2005). Dans ces conditions, la SphK2 est localisée au RE où elle induit une mobilisation calcique nécessaire au relargage du cytochrome c mitochondrial (Maceyka et al., 2005). De plus, la SphK2 est impliquée dans la sensibilisation à l'apoptose chimio-induite de nombreux types cellulaires (Igarashi et al., 2003; Liu et al., 2003; Min et al., 2004; Okada et al., 2005). Les travaux initiaux relatant le rôle pro-apoptotique de la SphK2 se sont basés sur la surexpression forcée de la protéine ; cependant, plusieurs études suggèrent également que la forme endogène ait la même fonction. Notamment, la déplétion par interférence ARN de la SphK2 dans la lignée HEK293 ou des fibroblastes embryonnaires murins prévient l'induction de l'apoptose en réponse au TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) (Chipuk et al., 2012; Okada et al., 2005).

Les SphKs sont des régulateurs du cycle cellulaire. La surexpression de la SphK1 dans des fibroblastes murins induit de façon anticipée la sortie de la phase G1 et une accumulation des cellules dans la phase S (Olivera et al., 1999). De plus, l'activation de la SphK1 par le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) stimule l'activité de Cdk2, un important régulateur de la transition G1/S (Rani et al., 1997). La déplétion de la SphK1 induit une augmentation de l'expression des inhibiteurs de Cdks p21 et p27^{Kip1} ainsi qu'une accumulation des cellules dans la phase G1 du cycle cellulaire (Gao and Smith, 2011; Xia et al., 2012). Par ailleurs, il a été décrit que la SphK2 nucléaire inhibe la synthèse d'ADN (Igarashi et al., 2003). De plus, la S1P produite dans le noyau régule de façon épigénétique l'expression de p21 et est associée à un arrêt de la prolifération cellulaire (Hait et al., 2009).

Comme nous le verrons plus tard, il devient aujourd'hui plus clair que l'apparente dualité SphK1 – SphK2 peut s'expliquer par le fait que ces deux enzymes ne sont pas distribuées de façon similaire dans la cellule et n'ont pas les mêmes substrats. *De facto*, elles n'influent pas de la même façon sur

le biostat céramide/S1P. La SphK1 diminue les taux de céramide, en phosphorylant la sphingosine, et probablement en induisant une inhibition de la CerS2 *via* la S1P produite (Laviad et al., 2008; Maceyka et al., 2005). Inversement, il est proposé que la SphK2 influence positivement le recyclage de la sphingosine en céramide (Maceyka et al., 2005). La compartimentalisation de la production de S1P est ainsi un important paramètre pour comprendre les fonctions biologiques des SphKs (cf. 2.4.2).

2.4. Régulation des SphKs

2.4.1. Activation

2.4.1.1. La SphK1

La SphK1 recombinante produite dans *Escherichia coli* est active, indiquant que l'enzyme possède une activité intrinsèque indépendante de toute modification post-traductionnelle (Pitson et al., 2000a). Cependant, cette activité catalytique peut être stimulée par différents mécanismes. La SphK1 peut être activée de façon rapide et transitoire par de multiples facteurs de croissance, hormones, cytokines, ligands de récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) (Maceyka et al., 2002; Pitson, 2011; Taha et al., 2006) ou autres stimuli externes comme l'hypoxie (Ader et al., 2008; Anelli et al., 2008) (Table 1). La plupart de ces agonistes induisent une phosphorylation de la SphK1 sur le résidu S225 par les kinases Erk1/2, entraînant une translocation de l'enzyme du cytosol à la membrane plasmique (Pitson et al., 2003). Cette phosphorylation s'accompagne également d'une augmentation critique de l'activité de la protéine (14 fois) sans modifier pour autant l'affinité de la SphK1 pour l'ATP ou la sphingosine. Dans la plupart des cas, cette activation est transitoire, en raison d'une déphosphorylation de la S225 par la PP2A (Barr et al., 2008).

La translocation de la SphK1 à la membrane apparaît cruciale pour la plupart des rôles de signalisation de la SphK1, probablement en permettant la production locale de S1P et son interaction avec des protéines effectrices (Pitson, 2011; Pitson et al., 2005). Il a été suggéré que la phosphorylation de la S225 puisse permettre l'interaction de l'enzyme avec la phosphatidylsérine, un phospholipide contenu dans le feuillet interne de la membrane plasmique, favorisant ainsi la translocation membranaire de la SphK1 (Stahelin et al., 2005). Des interactions avec l'acide phosphatidique et la filamine A ont également été impliquées dans ce processus (Delon et al., 2004; Maceyka et al., 2008). Il a été montré en 2010 que la protéine CIB1 (*Calcium and Integrin-Binding protein 1*) joue un rôle essentiel dans l'adressage de la SphK1 à la membrane. CIB1 interagit avec la SphK1 au niveau de son site de fixation de la calmoduline d'une façon dépendante du calcium. De façon analogue aux autres protéines d'échange calcium-myristoyl, CIB1 peut transloquer à la membrane plasmique, fournissant un mécanisme pour une translocation active de la SphK1 en réponse aux flux calciques, longtemps associés à une activation de l'enzyme (Jarman et al., 2010; Spiegel and Milstien, 2003; Sutherland et al., 2006).

Plusieurs protéines interagissant avec la SphK1 augmentent également son activité (Taha et al., 2006). On distinguera notamment TRAF2, impliquée dans la transduction de la signalisation du TNF- α (Xia et al., 2002), et de façon plus originale le régulateur de la traduction eEF1a (*elongation factor 1a*) dans sa configuration liée au GDP (Leclercq et al., 2011). A l'inverse, d'autres interactants comme la PP2A induisent une diminution de l'activité SphK1 en la déphosphorylant sur la S225 (Barr et al., 2008).

De nombreux agonistes entraînent une activation biphasique de la SphK1, induisant une augmentation rapide et transitoire de l'activité enzymatique suivie d'une seconde phase plus tardive impliquant la transcription et la traduction *de novo* de la SphK1 (Taha et al., 2006). La régulation de l'expression de la SphK1 est ainsi un paramètre non négligeable pour la modulation de ses effets biologiques. De nombreux agents induisant l'apoptose comme le TNF- α , ou les dommages à l'ADN déclenchent la protéolyse de la SphK1 (Taha et al., 2004).

2.4.1.2. La SphK2

Les mécanismes moléculaires de l'activation de la SphK2 sont moins connus. De façon similaire à la SphK1, l'activité catalytique de la SphK2 est rapidement augmentée suite à la stimulation de nombreux agonistes comme l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), le TNF- α , l'interleukine IL1- β , ou les esters de phorbol (Hait et al., 2005; Mastrandrea et al., 2005; Olivera et al., 2006). L'hypoxie a également été décrite comme activant la SphK2 *in vitro* et *in vivo* (Schnitzer et al., 2009; Wacker et al., 2009). La phosphorylation de l'enzyme par les kinases Erk1/2 conduit à une augmentation de son activité (Hait et al., 2007). De plus, il a été rapporté que l'interaction de la SphK2 avec eEF1A induit une forte activité SphK2 (Leclercq et al., 2008).

Table 1. Principaux activateurs de l'activité de la SphK1

Activateur	Mécanisme d'activation	Effet biologique	Référence
Facteurs de croissance			
PDGF	Translocation à la membrane plasmique	Mobilité cellulaire	(Olivera and Spiegel, 1993)
VEGF	—	Synthèse d'ADN	(Shu et al., 2002)
EGF	Translocation à la membrane plasmique ; augmentation de l'expression	Mobilité cellulaire	(Meyer zu Heringdorf et al., 1999)
IGF-1	Translocation à la membrane plasmique	Activation de Erk1/2	(El-Shewy et al., 2006; Gomez-Brouchet et al., 2007)
Ligands de RCPGs			
LPA	Translocation à la membrane plasmique ; augmentation de l'expression	Survie cellulaire	(Young et al., 1999)
S1P	—	Mobilisation calcique	(Meyer zu Heringdorf et al., 2001)
Acétylcholine	—	Mobilisation calcique	(Meyer zu Heringdorf et al., 1998)

Activateur	Mécanisme d'activation	Effet biologique	Référence
Hormones			
Oestradiol	Translocation à la membrane plasmide	Croissance cellulaire Transcription de la SphK1	(Sukocheva et al., 2003)
Prolactine	—	Expression de la SphK1	(Doll et al., 2007)
Cytokines			
TNF- α /IL-1 β	Interaction avec TRAF2 Activation de la PLD et Erk1/2	Activation de NF- κ B Mobilisation calcique Production de cytokines	(Billich et al., 2005; Mastrandrea et al., 2005; Sethu et al., 2008; Xia et al., 1998; Xia et al., 2002)
Interféron γ	—	Trafic vésiculaire	(Melendez et al., 1998)
Récepteurs aux immunoglobulines			
Fc ϵ R1	Translocation à la membrane	Chimiotactisme Dégranulation	(Melendez et al., 1998)
Esters de phorbols			
PMA	Translocation à la membrane et phosphorylation	Sécrétion de S1P Transcription de la SphK1	(Mazurek et al., 1994; Pitson et al., 2003)
Autres			
Vitamine D3	Transcription	Survie	(Kleuser et al., 1998)
LPS	Translocation à la membrane	Activation de Erk1/2 et NF- κ B	(Wu et al., 2004)
Stimuli environnementaux			
Hyperglycémie	Activation de la PKC et de Erk1/2	Expression de molécules d'adhérence	(Wang et al., 2005a)
Hypoxie	Stimulation par des espèces réactives de l'oxygène et la PLD ; augmentation de l'expression	Expression des facteurs HIF	(Ader et al., 2008) (Ahmad et al., 2006)

2.4.2. Localisation subcellulaire

La distribution cellulaire des SphKs et la compartimentalisation de la S1P générée sont largement reconnues aujourd'hui comme jouant un rôle important dans la régulation de leurs fonctions (Siow and Wattenberg, 2011; Wattenberg, 2010).

2.4.2.1. La SphK1

La SphK1 est une enzyme essentiellement cytosolique, résultat d'un état d'équilibre d'un transport actif de type « navette » entre cytoplasme et noyau (Inagaki et al., 2003). Il est bien établi que de nombreux stimuli induisent une relocalisation de la SphK1 à la membrane plasmique (cf. 2.3.1.1) nécessaire à la médiation de signaux de prolifération et de survie ainsi qu'à son rôle pro-tumoral (Pitson et al., 2005).

La SphK1 peut également être localisée aux membranes d'organites intracellulaires : son interaction avec RPK118 permet son adressage aux endosomes (Hayashi et al., 2002). Un autre interactant, la protéine aminoacylase 1, empêche sa localisation membranaire, la séquestrant dans le cytoplasme, diminuant légèrement son activité et potentialisant ses effets cytoprotecteur et prolifératif (Maceyka et al., 2004). La SphK1 peut également être retrouvée au niveau des

phagosomes où elle participe à la maturation des phagolysosomes (Thompson et al., 2005). Enfin, il a été montré qu'au cours de la phase S du cycle cellulaire, la SphK1 est transloquée à l'enveloppe nucléaire, suggérant un rôle dans la transition G1/S (Kleuser et al., 2001; Olivera et al., 1999).

En 2009, une étude a montré que la SphK1 peut être détectée au niveau des centrosomes, suggérant qu'elle joue un rôle dans le contrôle de la division cellulaire en participant notamment à la mise en place du fuseau mitotique (Gillies et al., 2009).

2.4.2.2. La SphK2

La distribution cellulaire de la SphK2 apparaît plus complexe, en regard de l'ambiguïté de ses fonctions. La SphK2 possède des séquences d'adressage et d'export nucléaire (cf. 2.1.4.2) suggérant qu'elle alterne entre noyau et cytoplasme. Sa localisation semble varier selon à la fois le type cellulaire et la densité des cultures. Par exemple, elle est principalement nucléaire dans la lignée HeLa, plutôt cytoplasmique dans les cellules HEK293 ; dans la lignée fibroblastique COS-7, la SphK2 devient nucléaire de façon proportionnelle à la confluence de la culture cellulaire (Igarashi et al., 2003).

Dans le noyau, la SphK2 a été décrite comme un inhibiteur de la synthèse d'ADN (Igarashi et al., 2003) et un régulateur des modifications épigénétiques de la chromatine et de la transcription en interagissant et modulant l'activité des HDAC1/2 (*Histone Deacetylases 1/2*) (Hait et al., 2009). En conditions de stress, la SphK2 est retrouvée au niveau du RE où il est possible qu'elle induise l'apoptose *via* l'action de S1P phosphatases et le recyclage de sphingosine en céramide (Maceyka et al., 2005). De plus, la localisation mitochondriale de la SphK2 est également impliquée dans l'induction de l'apoptose par un mécanisme de perméabilisation membranaire dépendant de la S1P et de BAK (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*) et un relargage de cytochrome c (Chipuk et al., 2012; Strub et al., 2011).

Les fonctions pro-apoptotiques de la SphK2 — non communes à la SphK1⁷ — semblent donc être médiées par sa localisation au niveau des membranes intracellulaires des organites comme le noyau, le RE ou encore les mitochondries. Le domaine de liaison aux lipides situé dans la partie N-terminale de la protéine permet d'interagir avec des phosphoinositides et pourrait faciliter ainsi la localisation différentielle de la SphK2 au niveau de ces membranes (Don and Rosen, 2009).

En outre, de récents travaux suggèrent que la disponibilité des substrats des SphKs soit également un facteur majeur de la fonction pro-apoptotique de la SphK2. Les deux SphKs peuvent phosphoryler la dihydrosphingosine, un sphingolipide généré au niveau des membranes intracellulaires — principalement, le RE. Il est donc possible que la SphK1 activée et adressée à la membrane plasmique n'utilise pas préférentiellement ce substrat, disponible alors pour la SphK2 (Siow et al., 2010). Les travaux du groupe de Sarah Spiegel ont montré que la S1P et la dihydroS1P produites par la SphK2 dans le noyau peuvent inhiber les HDAC1/2 et la prolifération cellulaire (Hait

⁷ Il est toutefois intéressant de noter que l'adressage artificiel de la SphK1 au noyau ou au RE peut conduire à l'induction d'apoptose, renforçant l'idée de signalisation dépendante de la localisation intracellulaire (Igarashi et al., 2003 ; Maceyka et al., 2005 ; Merrill et al., 2005).

et al., 2009). De plus, une étude récente combinant la technologie des nanoparticules et la thérapie photodynamique dans le traitement des tumeurs solides a rapporté que l'efficacité anti-tumorale peut être directement attribuée à la production de dihydroS1P par la SphK2 (Barth et al., 2013). Notamment, l'administration de dihydroS1P à des souris porteuses de tumeurs prévient la croissance tumorale et augmente la survie, à l'inverse de la S1P. Ainsi, il semblerait que ces deux sphingolipides en apparence très proches (la seule différence étant une double liaison entre les carbones C4-C5 pour la S1P) aient des fonctions pro-tumorales.

De façon analogue à la SphK1, la SphK2 est également retrouvée au niveau des centrosomes, suggérant un rôle des SphKs dans le contrôle de la division cellulaire (Gillies et al., 2009).

L'ensemble de ces travaux souligne l'importance de la localisation cellulaire des SphKs et de leur accessibilité subséquente à leurs substrats pour leurs fonctions biologiques.

2.4.2.3. Les SphKs extracellulaires

Plusieurs études rapportent également que les SphKs peuvent être relarguées par la cellule pour produire de la S1P au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique et dans le milieu extracellulaire. La SphK1 semble être sécrétée de façon constitutive mais également en conditions de stress (Tani et al., 2007; Venkataraman et al., 2006; Waters et al., 2003). La cellule apoptotique peut également relarguer une forme tronquée mais active de la SphK2, résultant d'un clivage de 138 acides aminés de la région N-terminale par la caspase-1 (Weigert et al., 2010).

Ces SphKs extracellulaires peuvent utiliser la sphingosine produite par la dégradation de la sphingomyéline et l'ATP relargué par les cellules pour produire directement de la S1P dans le milieu environnant (Elliott et al., 2009; Tani et al., 2007). Des études récentes ont caractérisé la présence de sphingosine et de la SphK1 dans des vésicules excrétées par les cellules tumorales, suggérant que ces vésicules servent de plateforme de production de S1P dans le milieu extracellulaire (Rigogliuso et al., 2010).

3. La voie SphKs/S1P

Comme nous l'avons vu plus haut, les sphingolipides sont aujourd'hui reconnus comme de véritables molécules de signalisation à part entière et sont impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques fondamentales comme la prolifération et la survie cellulaire, le cycle cellulaire, la sénescence, la migration, la réponse inflammatoire ou encore l'angiogenèse (Hannun and Obeid, 2008; Maceyka et al., 2012; Spiegel and Milstien, 2003).

Le céramide et la S1P ont été particulièrement la cible de recherches intensives au cours de ces vingt dernières années. Leur dualité explicitée par le concept de biostat céramide/S1P (cf. 1.2.3) souligne l'importance de la balance entre ces deux sphingolipides dans le devenir cellulaire (Cuvillier et al., 1996). Nous avons vu précédemment que le métabolisme sphingolipidique est un réseau complexe contrôlé par de nombreuses enzymes (cf. 1.2) ; cependant, les SphKs en sont considérées

comme des régulateurs clés. Leur activité est directement modulée par de nombreux stimuli externes agissant tels des leviers sur le biostat céramide/S1P (cf. Table 1) (Maceyka et al., 2002; Pitson, 2011; Taha et al., 2006). De plus, la découverte de l'implication de la voie SphKs/S1P dans de nombreux processus physiopathologiques comme le cancer, les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, l'obésité ou encore le diabète ont parachevé son intérêt et son ciblage thérapeutique (Maceyka et al., 2012).

De nombreuses études se sont attachées à décrire les mécanismes moléculaires de la signalisation SphKs/S1P. Il est aujourd'hui établi que la S1P produite par les SphKs agit à la fois de façon intra- et extracellulaire selon plusieurs voies distinctes (Strub et al., 2010).

3.1. La S1P, facteur paracrine et ligand de récepteurs transmembranaires

Le taux constitutif de S1P tissulaire est relativement faible, sans doute résultant de l'activité de la SPL (Schwab et al., 2005). Au contraire, on la retrouve bien plus concentrée dans le sang (de l'ordre du micromolaire) produite principalement par les érythrocytes et les plaquettes — qui ne possèdent ni l'activité S1P lyase ni l'activité S1P phosphatase — et l'endothélium vasculaire (English et al., 2000; Pappu et al., 2007; Venkataraman et al., 2008). La S1P plasmatique est essentiellement liée aux lipoprotéines de haute densité ou à l'albumine. La lymphe est également un compartiment riche en S1P (de l'ordre de 100 nM), produite majoritairement par l'endothélium lymphatique (Pham et al., 2010).

De par sa nature ambivalente, la S1P est peu capable de franchir passivement les membranes cellulaires et nécessite des transporteurs lipidiques. Plusieurs membres de la famille des transporteurs ABC (*ATB Binding Cassette*), notamment ABCA1, ABCC1 et ABCG2, ont été impliqués dans l'export de la S1P (Sato et al., 2007; Takabe et al., 2010). Plus récemment, le transporteur Spns2 (*Spinster homolog 2*), plus spécifique de la S1P⁸, a été identifié chez le poisson zèbre, puis chez l'homme (Hisano et al., 2011; Kawahara et al., 2009).

La S1P peut se lier et activer de façon autocrine ou paracrine une famille de cinq RCPGs nommés S1P₁₋₅ (Rosen et al., 2009). Initialement identifiés comme appartenant à la famille des récepteurs Edg (*Endothelial Differentiation Gene*), une double nomenclature persiste encore. De façon intéressante, la récente publication de la structure du S1P₁ en fusion avec le lysosome suggère que la S1P puisse activer ses récepteurs (S1PRs) par un mécanisme de diffusion latérale au sein du feuillet externe de la membrane plasmique plutôt que depuis le milieu extracellulaire (Hanson et al., 2012).

Les RCPGs sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à différentes protéines G hétérotrimériques, composés d'une sous-unité variable (G α) et de deux sous-unités constantes (G β et G γ). En réponse à la liaison du ligand sur le RCPG, la sous-unité G α se retrouve dans une conformation liée au GTP, provoquant une dissociation de l'hétérotrimère. La G α -GTP

⁸ Le transporteur Spns2 peut également exporter un analogue de la sphingosine, le FTY720, sous sa forme phosphorylée (FTY720-P) (cf. 3.3.1.3).

d'une part et le dimère $G\beta$ - $G\gamma$ peuvent alors activer diverses cascades de signalisation en aval comme l'adénylate cyclase, des phospholipases ou des canaux ioniques. On distingue quatre classes principales de sous-unités $G\alpha$ regroupées par similitude de séquence dont les membres principaux sont résumés ici : $G\alpha_s$ (activateurs de l'adénylate cyclase), $G\alpha_i$ (inhibiteurs de l'adénylate cyclase), $G\alpha_q$ (activateurs de la phospholipase C (PLC)), et $G\alpha_{12/13}$ (régulateurs de RhoA) (McCudden et al., 2005).

Les S1PRs sont couplés à différentes protéines $G\alpha$ pour signaler leurs effets biologiques. Selon leur couplages, ils peuvent ainsi agir en synergie ou au contraire de façon antagoniste (Hla and Brinkmann, 2011) (Figure 18).

3.1.1. Le S1P₁

Le S1P₁ a été initialement décrit comme le récepteur orphelin Edg-1 (pour *Endothelial Gene Differentiation-1*) dans les cellules endothéliales humaines (Hla and Maciag, 1990). Il est considéré comme étant ubiquitaire avec un gradient d'expression croissant entre le rein, le système cardiovasculaire, le poumon la rate et le cerveau (Brinkmann, 2007).

Il est exclusivement couplé à des protéines $G\alpha_i$, ses effets étant entièrement sensibles à la toxine pertussique (Windh et al., 1999). Son activation ($K_d = 8$ -20 nM) peut induire une diminution de la concentration intracellulaire d'AMPc (Zondag et al., 1998), la stimulation des MAPKs (Lee et al., 1996), une mobilisation calcique dépendante de la PLC (Okamoto et al., 1998), et l'activation de la voie PI3K/Akt conduisant à l'activation de eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*) (Morales-Ruiz et al., 2001) ou de la petite GTPase Rac. Le S1P₁ est généralement impliqué dans la signalisation de la prolifération, de la survie ou de la migration cellulaire.

Le KO murin du gène *S1P1* est létal au stade embryonnaire (E12,5-14,5). Les souris *S1P1*^{-/-} présentent un système cardiovasculaire immature, dû à un recrutement défailant des cellules musculaires lisses au niveau de la paroi des vaisseaux néo-synthétisés (Allende et al., 2003).

Le S1P₁, en conjugaison avec les S1P₂₋₃, joue un rôle important dans la fonction de la barrière endothéliale, régulant la formation des jonctions adhérentes entre les cellules endothéliales *via* les MAPKs et les GTPases Rho et Rac (Lee et al., 1999a; Lee et al., 1999b). Son inhibition *in vivo* induit notamment une augmentation de la perméabilité vasculaire (Sanna et al., 2006). Le S1P₁ joue également un rôle dans la neurogenèse (Mizugishi et al., 2005) et est intimement lié à la fonction des cellules du système immunitaire. Son expression est notamment requise pour la circulation des lymphocytes, son inhibition induisant leur séquestration au niveau des organes lymphoïdes et, de fait, une lymphopénie (Allende et al., 2004; Matloubian et al., 2004).

3.1.2. Le S1P₂

Le S1P₂ (ou Edg-5, H218 (MacLennan et al., 1994)) est, tout comme le S1P₁, exprimé par un large spectre de types cellulaires. Il lie la S1P avec une grande affinité ($K_d = 16$ -27 nM) et peut être couplé à des protéines $G\alpha_i$, $G\alpha_q$, et $G\alpha_{12/13}$ pour conduire à l'activation des MAPKs (Gonda et al., 1999), de la voie PI3K/Akt (Okamoto et al., 2000), de la PLC induisant une mobilisation calcique, ou de la voie Rho/ROCK (*Rho-associated Protein Kinase*) (Lepley et al., 2005). Contrairement au S1P₁, l'activation

du S1P₂ induit généralement une inhibition de la prolifération et de la migration de nombreux types cellulaires, la formation de fibres de stress et une augmentation de la perméabilité vasculaire impliquant la voie Rho/ROCK/PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog*) (Sanchez et al., 2007).

Le KO murin du gène *S1P2* est viable, ces souris naissant sans défaut anatomique ou physiologique apparent. Cependant, elles souffrent de façon sporadique de convulsions parfois létales entre trois et sept semaines de vie dues à des défauts d'excitabilité neuronale (MacLennan et al., 2001). Le S1P₂ serait également essentiel au fonctionnement normal des systèmes vestibulaire et auditif, sa déficience entraînant la surdité des animaux (Kono et al., 2007). Cependant, ces effets semblent dépendant du fond génétique des modèles animaux utilisés. Son expression favorise la capacité de régénération du foie (Ikeda et al., 2009; Serriere-Lanneau et al., 2007) et, en conditions hypoxiques, peut induire des rétinopathies (Skoura et al., 2007). Son activation, en combinaison avec celle du S1P₃, a un effet protecteur sur le myocarde dans des modèles d'ischémie/reperfusion (Means et al., 2007).

3.1.3. Le S1P₃

Le S1P₃ (ou Edg-3 (Yamaguchi et al., 1996)) est exprimé largement dans l'organisme. Son affinité pour la S1P est proche de celles des S1P₁₋₂ ($K_d = 23-26$ nM) et il est également couplé aux protéines $G\alpha_i$, $G\alpha_q$, et $G\alpha_{12/13}$ (Ancellin and Hla, 1999; Windh et al., 1999). Sa stimulation induit l'activation des MAPKs, de la voie PI3K/Akt, ou de la PLC ainsi que des petites GTPases Rho et Rac (An et al., 2000; Okamoto et al., 2000) permettant au S1P₃ de réguler la prolifération, la survie et la migration cellulaire, ainsi que le tonus vasculaire grâce à la libération d'oxyde nitrique *via* eNOS (Levkau et al., 2004; Means et al., 2007; Nofer et al., 2004).

Les souris KO pour le gène *S1P3* sont viables, fertiles et se développent normalement sans anomalie phénotypique évidente, indiquant que ce récepteur n'est pas essentiel à l'embryogenèse, sa perte étant probablement compensée par d'autres récepteurs. Le S1P₃ agit en combinaison avec les S1P₁₋₂ au cours du développement pour réguler l'angiogenèse (Kono 2004).

3.1.4. Le S1P₄

Le S1P₄ (ou Edg-6 (Graler et al., 1998)) possède un profil d'expression limité, restreint essentiellement aux cellules des systèmes hématopoïétique et lymphatique. Il est couplé aux protéines $G\alpha_i$ et $G\alpha_{12/13}$. Son interaction avec la S1P ($K_d = 12-63$ nM) active préférentiellement les voies PLC/IP₃ (inositol triphosphate)/Ca²⁺, MAPKs et Rho (Van Brocklyn et al., 2000; Yamazaki et al., 2000). Ses effets biologiques sont mal caractérisés, les études menées sur les animaux KO pour le *S1P4* ont montré que ce récepteur affecte de façon marginale les fonctions des lymphocytes T (Wang et al., 2005b) et est impliqué dans la migration des cellules dendritiques (Schulze et al., 2011).

3.1.5. Le S1P₅

Dernier récepteur identifié et caractérisé, le S1P₅ (ou Edg-8 (Glickman et al., 1999)) est principalement exprimé dans le cerveau, la rate, les poumons, le placenta et les leucocytes du sang périphérique (Im et al., 2001). Il est le récepteur le plus affiné pour la S1P ($K_d = 2-6$ nM) et est couplé

aux protéines $G\alpha_i$ et $G\alpha_{12/13}$, activant les voies PLC/IP₃/Ca²⁺, PI3K/Akt et Rho, et inhibant celles de l'adénylate cyclase (AC) et Erk1/2 (Gonda et al., 1999; Im et al., 2001; Jaillard et al., 2005; Malek et al., 2001; Novgorodov et al., 2007). Fortement exprimé par les oligodendrocytes, ses fonctions biologiques ont été principalement étudiées au niveau du système nerveux central. Le S1P₅ induirait la survie des oligodendrocytes (Jaillard et al., 2005) et participerait à la fonction de la barrière endothéliale au niveau du cerveau (van Doorn et al., 2012). Le S1P₅ est également impliqué dans la circulation des cellules NK (*Natural Killer*) (Mayol et al., 2011; Walzer et al., 2007). Une étude récente indiquant une localisation subcellulaire du S1P₅ au niveau des centrosomes a suggéré qu'il participe au contrôle de la division cellulaire (Gillies et al., 2009).

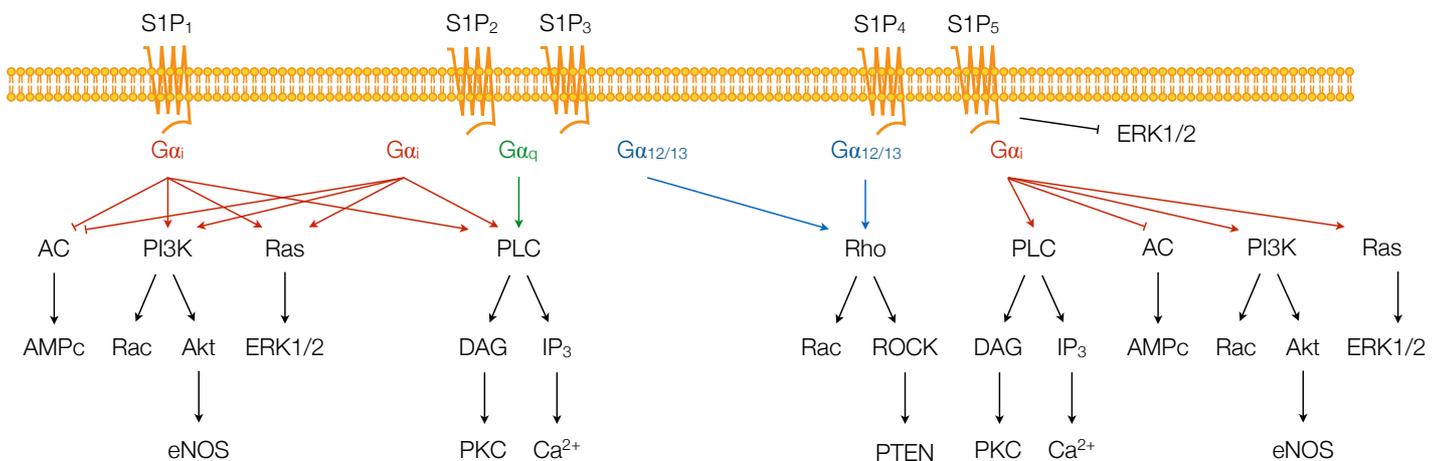


Figure 18. Signalisation des S1PRs. Les S1PRs font partie de la superfamille des RCPGs. Chaque récepteur est couplé à différentes sous-unités $G\alpha$ pour signaler ses effets biologiques.

3.2. La S1P, messenger intracellulaire et ses cibles

De nombreuses études ont suggéré que la S1P pouvait agir de façon intracellulaire. Les organismes modèles *Saccharomyces cerevisiae* et *Dictyostelium discoideum* répondent à la S1P alors qu'ils sont dépourvus de ses récepteurs (Birchwood et al., 2001). Chez les végétaux, qui n'expriment pas non plus les S1PRs, la S1P régule l'ouverture des stomates en réponse à la sécheresse (Ng et al., 2001). De plus, de façon analogue à une stimulation dans le milieu extracellulaire, la micro-injection cytosolique de S1P induit une mobilisation calcique et peut stimuler la motilité cellulaire (Meyer zu Heringdorf et al., 2003; van Koppen et al., 2001; Wang et al., 1999a). Depuis une vingtaine d'années, les mécanismes moléculaires de cette signalisation intracellulaire restaient obscurs mais récemment, plusieurs cibles intracellulaires de la S1P ont été identifiées notamment grâce aux travaux pionniers du groupe de Sarah Spiegel dans ce domaine.

3.2.1. La S1P, régulateur des HDAC1/2

La SphK2 est retrouvée au niveau nucléaire dans de nombreux types cellulaires ; cependant ses fonctions demeuraient obscures. En 2009, il a été montré pour la première fois que le noyau contenait des quantités importantes de sphingosine et de S1P. De plus, la SphK2 nucléaire est intégrée dans un complexe répresseur où la S1P produite se lie aux HDAC1/2 pour inhiber leur activité (Hait et al., 2009). La SphK2 est retrouvée notamment au niveau des promoteurs des gènes de p21 et du régulateur transcriptionnel c-fos, où elle contrôle l'acétylation des histones et augmente leur transcription (Hait et al., 2009).

3.2.2. La S1P, cofacteur de l'E3 ligase TRAF2

TRAF2 est une protéine adaptatrice du récepteur au TNF- α impliquée dans la régulation de l'ubiquitination de RIP1 (*Receptor-Interacting Protein 1*), un processus critique dans l'activation de NF- κ B (*Nuclear Factor- κ B*). TRAF2 est capable d'interagir avec la SphK1 et de l'activer (cf. 2.4.1.1). En 2010, la S1P a été identifiée comme un cofacteur requis pour l'activité E3 ligase de TRAF2, permettant la polyubiquitination de RIP1 sur sa L63 et l'activation subséquente de NF- κ B (Alvarez et al., 2010).

3.2.3. La S1P et la prohibitine 2

La prohibitine 2 (PHB2), une protéine hautement conservée régulant l'assemblage et la fonction des mitochondries, a récemment été caractérisée comme liant la S1P *in vitro* et *in vivo* (Strub et al., 2011). La PHB2 est préférentiellement localisée à la membrane interne des mitochondries où elle semble former un large complexe macromoléculaire avec la PHB1. La respiration mitochondriale est réduite dans les souris *SPhK2^{-/-}* en raison d'un assemblage aberrant et d'une activité réduite de la cytochrome-c oxydase, ou complexe IV de la chaîne de transport des électrons. Ces données suggèrent l'importance de l'interaction entre la S1P et la PHB2 dans la fonction de cette enzyme et plus largement dans la respiration mitochondriale.

3.2.4. La S1P et la BACE1

Le peptide β -amyloïde (A β) est le principal composant des plaques séniles impliquées dans le développement de la maladie d'Alzheimer. La protéine BACE1 (*β -site Amyloid Precursor Protein (APP) Cleaving Enzyme-1*), ou β -sécrétase 1, est l'enzyme produisant le peptide A β à partir d'APP (*Amyloid Precursor Protein*). Une étude récente a montré que son activité est modulée par la S1P dans les neurones (Takasugi et al., 2011). L'inhibition des SphKs ou la surexpression des enzymes dégradant la S1P diminuent l'activité de la BACE1 et la production de peptide A β . La S1P peut se lier spécifiquement à la BACE1 et augmenter son activité protéolytique. De plus, de façon notable, l'activité SphK2 est retrouvée significativement augmentée chez les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer, suggérant un lien unique entre la production de S1P par la SphK2 et cette pathologie neurodégénérative (Takasugi et al., 2011).

3.3. Physiopathologie de la voie SphKs/S1P

La voie SphKs/S1P est impliquée dans la régulation de nombreux processus biologiques et physiologiques fondamentaux. Son importance en physiopathologie a largement été étudiée au cours de ces deux dernières décennies. Son rôle dans le cancer est bien établi, mais la voie SphKs/S1P est également impliquée dans les pathologies liées à l'inflammation et à l'immunité, les maladies cardiovasculaires, l'obésité ou encore le diabète (Figure 19).

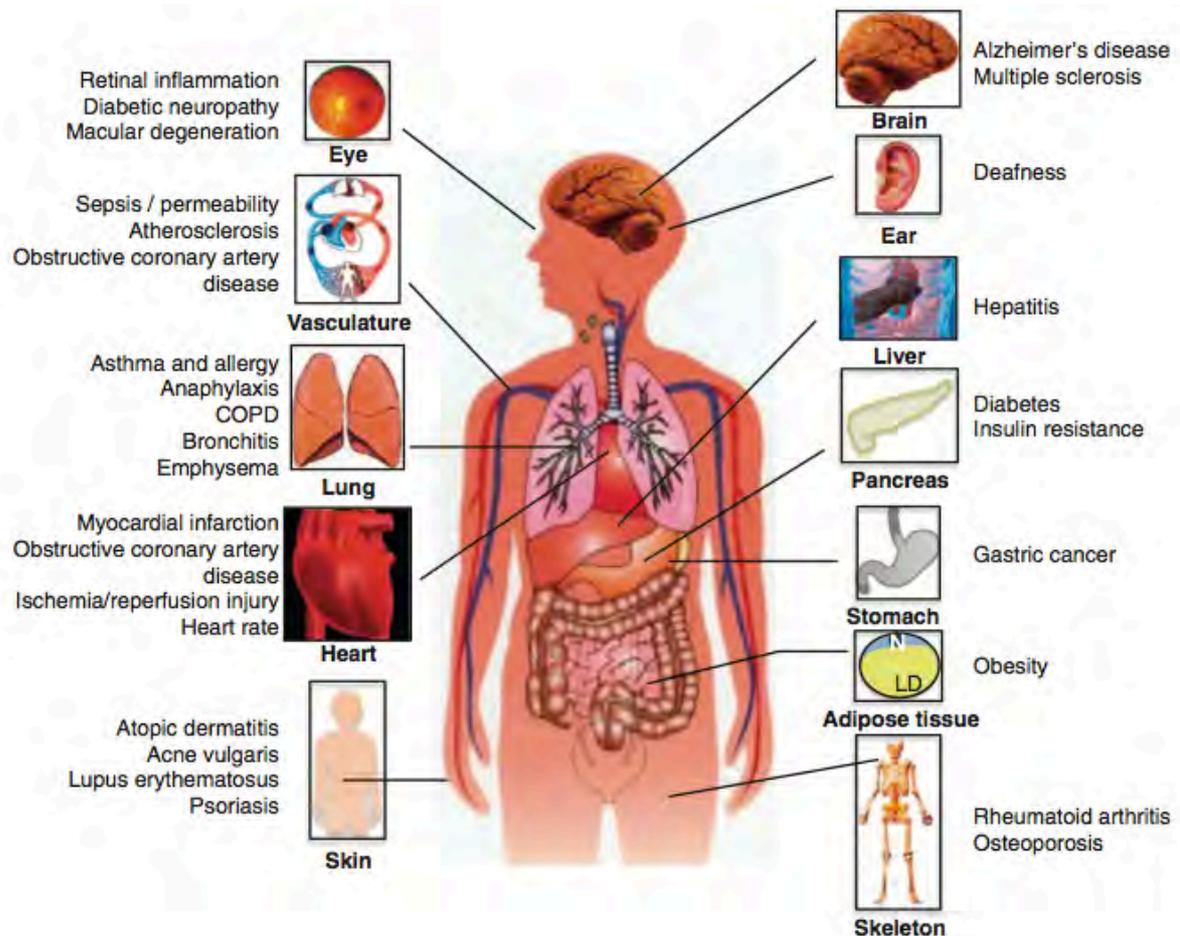


Figure 19. Physiopathologie de la voie SphKs/S1P La voie SphKs/S1P étant impliquée dans de très nombreux cancers bien que peu d'entre eux soient représentés ici. Tiré de (Maceyka et al., 2012).

3.3.1. Cancer

3.3.1.1. Implication de la voie SphKs/S1P dans le développement et la progression tumorale

Les propriétés pro-prolifératives et anti-apoptotiques de la S1P ont depuis longtemps suggéré que la régulation du biostat céramide/S1P — et de l'activité des SphKs — participe au développement tumoral (Cu villier et al., 1996). En 2000, Xia *et al.* ont mis pour la première fois en évidence que la surexpression de la SphK1 dans des fibroblastes murins NIH3T3 conduit à l'acquisition de propriétés transformantes comme la prolifération en privation de sérum, la formation de colonies en agar mou,

ou encore la formation de tumeurs, en l'occurrence de fibrosarcomes, chez la souris immunodéficiente SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) (Xia et al., 2000). Cette transformation, impliquant la voie Ras, est dépendante de l'activité catalytique de la SphK1, le mutant inactif G82D n'induisant aucun de ces effets. De façon intéressante, la localisation de la SphK1 à la membrane plasmique paraît essentielle à sa fonction pro-tumorale (Pitson et al., 2005). A la base de ces observations, la SphK1 a initialement été décrite comme un oncogène. Cependant, à ce jour, aucune mutation du gène de la SphK1 n'a été identifiée, posant ainsi la question : la SphK1 est-elle un oncogène ? Il est possible que la transformation spontanée des fibroblastes soit amplifiée par la surexpression de la SphK1. De plus, il est décrit que les cellules cancéreuses possèdent une forte expression de la SphK1 importante pour leur survie et leur prolifération, conduisant à proposer qu'elles ont plutôt une « addiction non-oncogénique » pour la SphK1 (Vadas et al., 2008).

Il est aujourd'hui bien établi que, dans le cadre du cancer, le biostat céramide/S1P est déséquilibré dans le sens de la production de S1P (Table 2). De nombreuses études ont rapporté une augmentation de l'expression de l'ARNm, de la protéine, ou une amplification de l'activité de la SphK1 dans une large série de tumeurs en comparaison au tissu sain. C'est notamment le cas dans les cancers du sein, de la prostate, du rein, du côlon, du poumon, de l'estomac, de l'utérus, de l'ovaire, dans le glioblastome, ou encore dans la leucémie aigüe myéloïde (Cuvillier et al., 2010; French et al., 2003; Johnson et al., 2005; Kawamori et al., 2006; Kohno et al., 2006; Li et al., 2009; Ruckhaberle et al., 2008; Song et al., 2011). Dans plusieurs de ces études, l'augmentation de l'expression de la SphK1 corrèle avec un grade tumoral plus important et, surtout, avec une survie des patients réduite (Table 2).

Concernant la SphK2, beaucoup moins d'études sont disponibles décrivant son implication dans le cancer. La SphK2 n'est pas retrouvée surexprimée dans le cancer. De plus, aucune corrélation n'a été faite jusqu'à présent entre le niveau d'expression de la SphK2 et le grade, le degré d'agressivité d'un cancer, ou encore la survie des patients. Toutefois, il est intéressant de noter que le ciblage de la SphK2 est plus efficace que celui de la SphK1 dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (Gao and Smith, 2011; Van Brocklyn et al., 2005). Notamment, la déplétion de la SphK2 dans les cellules MCF-7 réduit leur blocage dans le cycle cellulaire à la transition G2/M induit par la doxorubicine et augmente fortement l'apoptose subséquente, probablement en agissant sur l'expression de p21 (Gao and Smith, 2011). Des études *in vivo* ont rapporté que la croissance tumorale pouvait être significativement atténuée par la déplétion génétique de la SphK2 dans des xénotransplantes de la lignée MCF-7 tumorale mammaire (Weigert et al., 2009), ou par l'inhibition pharmacologique de la SphK2 de tumeurs murines du sein (Antoon et al., 2011; Antoon et al., 2012; French et al., 2010), du rein et du pancréas (Beljanski et al., 2010; Beljanski et al., 2011a), du foie (Beljanski et al., 2011b) ou encore du côlon (Chumanevich et al., 2010). De plus, la SphK2 a été impliquée dans la migration des cellules cancéreuses de l'œsophage induite par le TGF- β (*Tumor Growth Factor- β*) (Miller et al., 2008), et des cellules tumorales mammaires stimulée par l'EGF (*Epithelial Growth Factor*) (Hait et al., 2005), suggérant un rôle potentiel de la SphK2 dans le processus métastatique.

Table 2. Dérégulation de la production de S1P dans le cancer

Tumeur	Echantillons	Corrélation biologique	Référence
Sphingosine kinases			
Estomac	ARNm	4 paires*	Surexpression de la SphK1 dans la tumeur <i>versus</i> le tissu sain.
	Protéine	175 patients, 10 contrôles	Surexpression de la SphK1 dans la tumeur <i>versus</i> le tissu sain. Corrélation entre augmentation de l'expression de la SphK1 et la progression de la maladie. Survie des patients réduite si l'expression de la SphK1 est forte.
Sein	ARNm	1269 patients	Corrélation entre augmentation de l'expression de la SphK1 et mauvais pronostic. Réduction du temps de survie sans récurrence si l'expression de la SphK1 est forte. Surexpression de la SphK1 dans les tumeurs ER ^{neg} .
	Protéine	171 patients	Surexpression de la SphK1 dans la tumeur <i>versus</i> le tissu sain.
Poumon	ARNm	11 paires ; 25 paires	Surexpression de la SphK1 dans la tumeur <i>versus</i> le tissu sain.
	Protéine	25 paires	Surexpression de la SphK1 dans la tumeur <i>versus</i> le tissu sain.
Côlon	ARNm	32 paires ; 35 paires	Surexpression de la SphK1 dans la tumeur <i>versus</i> le tissu sain.
	Protéine	75 tumeurs, 35 contrôles	Corrélation entre niveau d'expression de la SphK1 et progression tumorale. Forte expression dans les cancers primaires avec métastases par rapport au non-métastatiques.
Prostate	Protéine	30 paires	Augmentation de l'activité de la SphK1 dans la tumeur <i>versus</i> le tissu sain. Corrélation entre niveau d'activité de la SphK1 et score de Gleason, taux de PSA, et risque de récurrence.
Utérus	ARNm	42 paires ; 40 paires	Surexpression de la SphK1 dans la tumeur <i>versus</i> le tissu sain.
Rein	ARNm	20 paires	Surexpression de la SphK1 dans la tumeur <i>versus</i> le tissu sain.
Pancréas	Protéine	60 patients, 10 contrôles	Surexpression de la SphK1 dans la tumeur <i>versus</i> le tissu sain.
Astrocytome	ARNm	4 paires	Surexpression de la SphK1 dans la tumeur <i>versus</i> le tissu sain.
	Protéine	243 patients ; 48 patients	Corrélation entre niveau d'expression de la SphK1, grade tumoral et survie réduite des patients
Glioblastome	ARNm	48 patients	Corrélation entre niveau d'expression de la SphK1 et la survie des patients.
Lymphome non-hodgkinien	ARNm et protéine	44 patients, 25 contrôles	Surexpression de la SphK1 dans le lymphome non-hodgkinien par rapport à l'hyperplasie lymphoïde
Autres enzymes du métabolisme de la S1P			
Prostate	Protéine et activité	13 patients	Répression de l'expression de la SPL dans la tumeur <i>versus</i> le tissu sain. Corrélation entre niveau d'expression faible de la SPL et agressivité du cancer.
Ovaire	ARNm	37 patients ; 50 contrôles	Surexpression de la SPL dans la tumeur <i>versus</i> le tissu sain.
Côlon	ARNm	10 paires	Répression de l'expression de la SPL dans la tumeur <i>versus</i> le tissu sain.

Tumeur	Echantillons	Corrélation biologique	Référence	
Récepteurs à la S1P				
Glioblastome	ARNm et protéine	38 patients	Corrélation entre faible niveau d'expression du S1P ₁ et survie réduite pour le patient.	(Yoshida et al., 2010a)
Lymphome	Gène	106 patients	Identification de mutations somatiques multiples dans la séquence 5'du S1P2 pour 26% des cas.	(Yoshida et al., 2010b)
Leucémie	ARNm	31 patients, 12 contrôles	Surexpression du S1P ₅ dans les lymphocytes.	(Kothapalli et al., 2002)

* La tumeur et le tissu sain adjacent.

L'analyse des fluides d'ascites de patientes de cancers de l'ovaire révèle une augmentation significative du taux de S1P (Wang et al., 2008; Xu et al., 2001), alors qu'une forte diminution de la S1P plasmatique est observée en post-opératoire *versus* les taux mesurés en pré-opératoire (Sutphen et al., 2004). Ainsi, la S1P extracellulaire, notamment relarguée dans le microenvironnement tumoral, joue des rôles cruciaux dans la progression du cancer en régulant la croissance tumorale, l'angiogenèse ou encore le processus métastatique (Anelli et al., 2010; Kim et al., 2011; Ponnusamy et al., 2012; Salas et al., 2011). Selon les récepteurs à la S1P majoritairement exprimés, et selon les cellules tumorales, la S1P peut exercer divers effets.

Une étude a récemment identifié le S1P₁ comme un élément clé impliqué dans l'activation persistante de STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription-3*) dans les cellules cancéreuses et le microenvironnement tumoral (Lee et al., 2010). STAT3 est un facteur de transcription du gène *S1P1*, et inversement, le S1P₁ active STAT3 et induit l'expression de l'interleukine pro-inflammatoire IL-6 cruciale pour l'activation de STAT3, l'inflammation et la progression tumorale.

Le S1P₂ et le S1P₃ ont notamment des actions opposés dans la migration et la motilité des cellules tumorales gastriques (Yamashita et al., 2006). Le S1P₂ est également impliqué dans l'inhibition de la migration de cellules de mélanome ou la motilité de cellules issues de glioblastome, alors qu'il augmente les propriétés invasives de ces dernières (Arikawa et al., 2003; Malchinkhuu et al., 2008; Yamamura et al., 2000; Young and Van Brocklyn, 2007). A l'inverse, la S1P stimule la migration de cellules de fibrosarcome *via* l'axe S1P₁/Rac1/Cdc42 (Fisher et al., 2006; Nyalendo et al., 2007), ou l'invasion de cellules du cancer ovarien par le S1P₁ ou le S1P₃ (Park et al., 2007). Enfin, la stimulation du S1P₅ bloque notamment la prolifération de cellules de glioblastome (Rodgers et al., 2009).

La S1P extracellulaire et les S1PRs sont impliqués dans le développement du système vasculaire (cf. 3.1). De nombreuses études ont caractérisé leurs rôles dans la régulation de l'angiogenèse tumorale. Le S1P₁ est fortement exprimé par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins en périphérie de la tumeur (Chae et al., 2004). Sa déplétion *in vitro* par siRNA (*small interfering Ribonucleic Acid*) diminue les capacités migratoires des cellules endothéliales. L'injection *in vivo* de ce siRNA dans un modèle de tumeurs sous-cutanée entraîne la déstabilisation de son système vasculaire et une forte réduction de la croissance tumorale. *A contrario*, le S1P₂ régule négativement la migration cellulaire et l'angiogenèse (Du et al., 2010). Les cellules endothéliales issues de souris

KO pour le S1P₂ ont de fortes propriétés prolifératives, migratoires ou encore de formation de tubules *in vitro*. L'injection de cellules de carcinome pulmonaire ou de mélanome chez la souris S1P2^{-/-} se traduit par une accélération de la croissance tumorale, une densité vasculaire et des recrutements de péricytes et de cellules musculaires lisses autour des vaisseaux plus importants.

Une étude a récemment mis en évidence pour la première fois un lien entre la S1P produite par l'organisme hôte et le processus métastatique (Ponnusamy et al., 2012). Chez des souris TRAMP^{+/+} / SPHK1^{-/-}, la croissance des tumeurs de la prostate spontanée est réduite, tout comme les métastases pulmonaires induite par l'allogreffe cellules cancéreuses. La déplétion génique de la SphK1 augmente l'expression du suppresseur de métastase Brms1 (*Breast Carcinoma Metastasis Suppressor 1*) dans les tumeurs pulmonaires obtenues par l'injection de cellules MB49 dans la circulation sanguine. La suppression systémique de la SphK1 stimule l'expression du S1P₁, et diminue celle du S1P₂ ce qui induit l'expression de Brms1. De façon intéressante, cette étude montre pour la première fois que l'inhibition de la signalisation de la S1P systémique par l'utilisation d'un anticorps bloquant prévient l'apparition de métastases pulmonaires.

Il existe de larges interactions impliquées dans le cancer entre les voies de signalisation de la S1P et celles de facteurs de croissance. Les S1PRs peuvent agir de concert avec leurs récepteurs pour réguler la prolifération et la migration cellulaires ou encore l'angiogenèse. Les mécanismes de telles régulations impliquent notamment la transactivation de récepteurs à activité tyrosine kinase induite par la S1P. Par exemple, l'EGF stimule l'expression et l'activité de la SphK1 pour réguler la migration cellulaire (Meyer zu Heringdorf et al., 1999) (Table 1). Il a été rapporté que la S1P peut induire le relargage de l'EGF et, *de facto*, la transactivation de l'EGFR (*Epithelial Growth Factor Receptor*) dans des cellules du cancer de l'estomac ou du sein (Shida et al., 2004; Sukocheva et al., 2006). De plus, des interactions croisées entre les récepteurs de la S1P et de l'acide lysophosphatidique (LPA) ou des œstrogènes ont été impliquées dans la progression du cancer, notamment celui du sein (Shida et al., 2008; Sukocheva et al., 2006; Takabe et al., 2010). La S1P peut transactiver le PDGFR β (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor β*) chez des cellules du cancer de l'ovaire, induisant une stimulation de Erk1/2 et Akt (Baudhuin et al., 2004). Dans un modèle de cellules musculaires lisses, ou chez des fibroblastes embryonnaires murins, le S1P₁ et le PDGFR β forment un complexe de signalisation dans lequel le S1P₁ augmente l'activité de Erk1/2 et la migration cellulaire induite par le PDGF (Alderton et al., 2001; Long et al., 2006; Waters et al., 2003). Il s'agit d'un exemple de « signalisation intégrée » caractérisée par l'induction de voies coopératives par deux types distincts de récepteurs et leurs effecteurs sous-jacents (Delcourt et al., 2007). Des interactions croisées entre les signalisations de la S1P et du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) ont été également identifiées dans la régulation de l'angiogenèse (Taniguchi et al., 2009).

Des études émergentes rapportent des altérations d'expression ou des mutations des S1PRs dans le cancer, bien que la relevance physiopathologique de ces observations n'est pas encore claire (Kothapalli et al., 2002; Yoshida et al., 2010a; Yoshida et al., 2010b).

3.3.1.2. Implications de la voie SphKs/S1P dans la résistance thérapeutique du cancer

La déplétion de la SphK1 par siRNA inhibe la prolifération cellulaire, augmente la production de céramide et l'apoptose dans le cancer de la prostate, du pancréas et la leucémie (Akao et al., 2006; Baran et al., 2007; Guillermet-Guibert et al., 2009; Pchejetski et al., 2005). *A contrario*, la surexpression de la SphK1 inhibe l'apoptose et favorise la chimiorésistance *in vivo* (Baran et al., 2007; Pchejetski et al., 2005; Sobue et al., 2008). Dans le cas du cancer de la prostate, la surexpression de la SphK1 confère une résistance à la camptothécine et au docétaxel (Akao et al., 2006; Pchejetski et al., 2008; Pchejetski et al., 2005). Pour le cancer du pancréas, les cellules exprimant fortement la SphK1 sont résistantes à la gemcitabine (Guillermet-Guibert et al., 2009). Une résistance à l'imatinib a également été décrite dans le cadre de la leucémie aigüe myéloïde (Baran et al., 2007; Bonhoure et al., 2008; Bonhoure et al., 2006). Il a été suggéré qu'une relation existe entre le taux d'activité de la SphK1 et la résistance au tamoxifène chez des cellules issues de cancer du sein (Sukocheva et al., 2009). Notre équipe a montré que la SphK1 peut être impliquée dans l'acquisition de l'indépendance androgénique du cancer de la prostate. La privation chronique en androgènes — qui mime les thérapies anti-androgéniques — entraîne chez des cellules de cancer de la prostate sensibles à ces molécules l'acquisition d'une indépendance androgénique qui corrèle avec une augmentation de l'expression et de l'activité de la SphK1 (Dayon et al., 2009). Cette indépendance peut être antagonisée par l'inhibition de la voie PI3K/Akt ou de la SphK1.

De façon générale, l'efficacité des agents chimiothérapeutiques corrèle avec le taux d'inhibition de la SphK1 (Pchejetski et al., 2005; Sobue et al., 2008). Des expériences *in vivo* ont mis en évidence que le taux d'expression de la SphK1 peut être un « senseur chimiothérapeutique » (Pchejetski et al., 2005). Par exemple, de plus larges tumeurs sont obtenues chez la souris par l'injection de cellules du sein dans la glande mammaire ou de cellules de la prostate de façon orthotopique si ces cellules surexpriment la SphK1 plutôt qu'un taux endogène (Nava et al., 2002; Pchejetski et al., 2005). Les tumeurs formées ont également une néovascularisation plus importante, ont une meilleure résistance au docétaxel et présentent un ratio céramide/S1P diminué. En outre, la taille des adénomes intestinaux est réduite chez les souris *APC^{Min/+}, SPHK1^{-/-}* (Kohno et al., 2006). Ces tumeurs présentent une augmentation du taux de sphingosine qui induit une réduction de la prolifération des cellules épithéliales intestinales, une diminution de la phosphorylation de la protéine pRb et de l'expression du régulateur du cycle cellulaire CDC4 *in vitro* (Kohno et al., 2006).

Des conditions hypoxiques soutenues induisent l'expression des SphKs dans des cellules musculaires lisses pulmonaires (Ahmad et al., 2006). Le promoteur du gène *SPHK1* possède deux séquences HRE (*Hypoxia inducible factor-Responsive Element*) et les facteurs de réponse à l'hypoxie HIF-1 α et HIF-2 α (*Hypoxia Inducible Factor*) ont été impliqués dans la régulation transcriptionnelle de la SphK1 (Anelli et al., 2008; Schwalm et al., 2008). L'hypoxie promeut la migration des cellules endothéliales et induit la production de S1P par des cellules de glioblastome. Ainsi, la production de S1P en périphérie de la tumeur peut stimuler les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses pour induire le processus angiogénique et la formation de néo-vaisseaux en réponse à l'insuffisance en oxygène détectée par les senseurs HIF-1 α et HIF-2 α . Cependant, de

façon intéressante, les SphKs peuvent également moduler la sensibilité des cellules tumorales à la privation en oxygène en régulant l'expression de HIF-1 α et de HIF-2 α . En conditions hypoxiques, la SphK1 est activée selon un mécanisme impliquant la production d'espèces réactives de l'oxygène et induit la stabilisation de HIF-1 α dans de nombreuses lignées tumorales (Ader et al., 2008). Cette stabilisation implique l'activation de la voie Akt/GSK-3 β (*Glycogen Synthase Kinase-3 β*) pour prévenir la dégradation de HIF-1 α par le protéasome. L'inhibition de la SphK1 ou sa déplétion diminuent de façon drastique le niveau de HIF-1 α . La SphK2 est également sensible aux conditions hypoxiques. Dans des cellules d'adénocarcinome pulmonaire, l'hypoxie protège de la mort induite par l'étoposide en induisant l'expression de la SphK2, le relargage de S1P et la signalisation du S1P₁ et du S1P₃ (Schnitzer et al., 2009).

Récemment, la voie SphKs/S1P a été impliquée dans l'autophagie, un processus mis en place par les cellules induisant notamment leur survie ou leur mort en conditions de stress par recyclage de leurs propres composants. L'autophagie peut être induite par de nombreux stimuli comme le stress oxydant, la privation en nutriments ou le stress du RE, bien qu'elle soit constitutivement active de façon basale dans les cellules. Lorsqu'elle favorise la survie cellulaire, l'autophagie confère une résistance à la chimiothérapie, la radiothérapie ou encore à l'immunothérapie (Chen and Karantza-Wadsworth, 2009). Récemment, il a été montré que la privation en nutriments active la SphK1 dans des cellules de cancer du sein, permettant leur survie par l'autophagie. Dans ces cellules, la surexpression de la SphK1 suffit à déclencher le processus autophagique (Lavieu et al., 2006). La S1P peut promouvoir la survie cellulaire dépendante de l'autophagie dans des cellules du cancer de la prostate carencées en nutriments par l'intermédiaire du S1P₅ et de l'inhibition de mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), un inhibiteur de l'autophagie (Chang et al., 2009). Inversement, le céramide induit la mort cellulaire par l'intermédiaire de l'autophagie. L'inhibition des SphKs induit également une mort cellulaire autophagique dans de nombreuses lignées cancéreuses et une réduction de la croissance tumorale *in vivo* (Beljanski et al., 2010; French et al., 2003; French et al., 2006; French et al., 2010). Le rôle des SphKs dans la régulation de la survie ou de la mort cellulaire induite par l'autophagie dans le contexte du cancer requiert de profondes investigations compte-tenu de l'importance de ce processus dans l'efficacité thérapeutique.

3.3.1.3. Ciblage de la voie SphKs/S1P dans les stratégies thérapeutiques anti-tumorales

La voie SphKs/S1P est, comme nous venons de le voir, largement impliquée dans le développement et la progression tumorale. *De facto*, elle constitue une cible très intéressante dans la thérapie anti-cancer et de nombreuses molécules dirigées contre les SphKs, la S1P ou les S1PRs ont été développées dans le but d'améliorer l'efficacité des stratégies anti-tumorales (Table 3).

Table 3. Ciblage de la voie SphKs/S1P en stratégie anti-tumorale

Molécule	Cibles	Usage	Effet biologique	Référence
Sphingosine kinases				
DMS (<i>N,N</i> -diméthylsphingosine) et DHS (<i>D,L-thréo</i> -dihydrosphingosine, Safingol)	SphK1, SphK2	<i>In vitro</i>	Inhibition compétitive de la fixation de la sphingosine (K_i ~5-10 μ M). Inhibition de la PKC et de la CerK. Peut activer la PI3K. Inhibe la croissance cellulaire, induit l'apoptose, sensibilise aux radiations et à la chimiothérapie.	(Endo et al., 1991; Igarashi et al., 1989; King et al., 2000a; Kohama et al., 1998; Liu et al., 2000; Megidish et al., 1995; Nava et al., 2002; Olivera et al., 1998; Sugiura et al., 2002)
		<i>In vivo</i>	Inhibition et régression de la croissance tumorale dans des modèles de xéngreffes de tumeurs de l'estomac et du poumon. Toxicité hépatique et effet hémolytique constatés.	
	Essai clinique	Safingol : Phase I en combinaison avec le cisplatine pour le traitement de tumeurs solides avancées.	(Dickson et al., 2011)	
SK1-I (BML-258 ; (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4- <i>N</i> -méthyl-5-(4-pentylphényl)-2-aminopent-4ène-1,3-diol)	SphK1	<i>In vitro</i>	Inhibition compétitive de la fixation de la sphingosine (K_i ~10 μ M). Aucune activité envers la PKC α et δ , PKA, Akt, ERK1, EGFR, Cdk2 ou IKK β . Inhibition de la croissance et de la survie cellulaire, induction de l'apoptose dans des modèles de leucémie ou de glioblastome.	(Kapitonov et al., 2009; Paugh et al., 2008)
		<i>In vivo</i>	Inhibition de la croissance tumorale de xéngreffes de leucémie aigüe myéloïde. Inhibe la croissance tumorale et l'angiogenèse, induit l'apoptose et augmente la survie de l'hôte dans un modèle de glioblastome.	
SKi (SKI-II ; 2-(<i>p</i> -hydroxyanilino)-4-(<i>p</i> -chlorophényl)thiazole)	SphK1, SphK2	<i>In vitro</i>	Inhibition non-compétitive de la liaison à l'ATP. Aucun effet sur la PI3K, ERK2 et la PKC α . Protéolyse de la SphK1. Inhibition de la prolifération et induction de l'apoptose dans plusieurs lignées tumorales. Sensibilisation de cellules du cancer du pancréas à la gemcitabine.	(French et al., 2003; French et al., 2006; Guillermet-Guibert et al., 2009; Loveridge et al., 2010)
		<i>In vivo</i>	Inhibition de la croissance d'adénocarcinomes mammaires syngéniques. Biodisponibilité orale.	
B-5354c (SANK 71896, composé naturel issu d'une bactérie marine)	SphK1, SphK2	<i>In vitro</i>	Inhibition non-compétitive de la fixation de la sphingosine (K_i ~3 μ M). Aucune activité envers la PI3K ou la PKC. Chimiosensibilisation de cellules cancéreuses de la prostate au docétaxel ou à la camptothécine.	(Kono et al., 2002; Kono et al., 2000b; Pchejetski et al., 2008)
		<i>In vivo</i>	Inhibition synergique avec la camptothécine de la croissance tumorale dans un modèle de greffe orthotopique de cancer de la prostate chez la souris.	
F-12509A (SANK 25395, composé naturel issu de la culture d'un discomycète)	SphK1, SphK2	<i>In vitro</i>	Inhibition compétitive de la fixation de la sphingosine (K_i ~5 μ M). Induction de l'apoptose dans des modèles leucémiques chimiosensibles ou résistants.	(Bonhoure et al., 2008; Bonhoure et al., 2006; Kono et al., 2002; Kono et al., 2000a)
PF-543	SphK1	<i>In vitro</i>	Inhibition compétitive de la fixation de la sphingosine (K_i ~3,6 nM). Hautes spécificité et affinité pour la SphK1. Aucun effet sur la prolifération et la survie de cellules de carcinome cervico-facial.	(Schnute et al., 2012)
		<i>Ex vivo</i>	Forte diminution des taux plasmatiques de S1P.	

Molécule	Cibles	Usage	Remarques	Référence
ABC294640 (3-(4-chlorophenyl)-adamantane-1-acide carboxylique (pyridine-4-ylméthyl)amide	SphK2	<i>In vitro</i>	Inhibition compétitive de la fixation de la sphingosine ($K_i \sim 10 \mu\text{M}$). Inhibition de la prolifération et de la migration dans de nombreuses lignées tumorales. Induction de la mort cellulaire par autophagie dans des modèles de cancer du rein, de la prostate et du sein.	(Beljanski et al., 2010; French et al., 2010)
		<i>In vivo</i>	Inhibition de la croissance tumorale et induction de l'apoptose dans des xénogreffes de cancer du sein. Induction de la mort cellulaire par autophagie dans des xénogreffes de cancer du rein. Biodisponibilité orale.	
S1P				
Anticorps anti-S1P Sphingomab™, Sonopizumab (ASONEP™)	S1P	<i>In vitro</i>	Réduction de la prolifération, de l'inhibition de l'apoptose et du relargage de facteurs angiogéniques (VEGF, FGF).	(O'Brien et al., 2009; Visentin et al., 2006)
		<i>In vivo</i>	Réduction de l'angiogenèse, de la croissance tumorale et du nombre de métastases dans le cancer du sein, de l'ovaire, du poumon et le mélanome. Réduction du nombre de lymphocytes circulants.	
		Essai clinique	ASONEP™ : Phase I pour les tumeurs solides. Phase II pour les carcinomes rénaux.	
Récepteurs à la S1P				
FTY720 (Fingolimod, Gilenya®) ; FTY720-phosphate	S1P ₁ , S1P ₃ , S1P ₄ , S1P ₅ , SphK1, SphK2	<i>In vitro</i>	Phosphorylation par la SphK2, agoniste du S1P ₁ , du S1P ₃ , du S1P ₄ et du S1P ₅ . Induit la dégradation du S1P ₁ . Inhibition de l'autotaxine, de la PLA2, de la SphK1, de la SPL et de la CerS. Activation de la PP2A. Inhibition de la phosphorylation d'Akt et de Erk1/2. Activation des caspases, de la JNK et de la PKCδ. Induit la production d'espèces réactives de l'oxygène. Arrêt de la prolifération et induction de l'apoptose dans plusieurs lignées cancéreuses.	(Azuma et al., 2003a; Azuma et al., 2003b; Azuma et al., 2002; Bandhuvula et al., 2005; Billich et al., 2003; Brinkmann et al., 2002; Hung et al., 2008; Kharel et al., 2005; Lahiri et al., 2009; LaMontagne et al., 2006; Mandala et al., 2002; Matsuoka et al., 2003; Payne et al., 2007; Sanchez et al., 2003; Ubai et al., 2007; van Meeteren et al., 2008; Vessey et al., 2007; Wang et al., 1999b)
		<i>In vivo</i>	Inhibition de la croissance tumorale dans de nombreux modèles de cancer. Inhibition de la vascularisation tumorale, de l'angiogenèse et du processus métastatique. Réduction du nombre de lymphocytes circulants. Réduction des taux plasmatiques de LPA.	
VPC23019	S1P ₁ , S1P ₃	<i>In vitro</i>	Antagoniste du S1P ₁ et S1P ₃ .	(Davis et al., 2005b)
JTE013	S1P ₂	<i>In vitro</i>	Antagoniste du S1P ₂ .	(Salas et al., 2011)

Au cours des vingt dernières années, de nombreux composés inhibiteurs des SphKs ont été identifiés, développés ou isolés de sources naturelles. Ces composés agissent notamment en réduisant la formation de S1P mais aussi en favorisant la production de sphingosine et de céramide.

Historiquement, les inhibiteurs des SphKs les plus utilisés sont des analogues de la sphingosine, la DMS et la DHS. Ces deux composés inhibent la croissance tumorale dans de nombreux modèles et

améliorent l'efficacité de la radiothérapie et d'agents chimiothérapeutiques (Cuvillier, 2007; Cuvillier et al., 2010). Cependant, leur spécificité envers les SphKs est moindre et il a été démontré qu'ils agissent également sur d'autres kinases comme la PKC, la CerK ou la PI3K (Endo et al., 1991; Igarashi et al., 1989; Sugiura et al., 2002). La DHS, ou safinol, a néanmoins fait l'objet d'un essai clinique de phase I en combinaison avec le cisplatine pour le traitement de tumeurs solides de stade avancé (Dickson et al., 2011). D'autres analogues de la sphingosine ou de la DHS ont été par la suite développés comme des inhibiteurs des SphKs. Ainsi, le SK1-I, un analogue soluble de la sphingosine, a été le premier inhibiteur considéré comme spécifique de la SphK1 (Paugh et al., 2008) (Table 3). Les premiers inhibiteurs non lipidiques des SphKs ont été identifiés par criblage (French et al., 2003). Parmi eux, le SKi, non compétitif pour la liaison de l'ATP, inhibe la prolifération et induit l'apoptose dans de nombreuses lignées cancéreuses (Pchejetski et al., 2008; Pchejetski et al., 2005; Sauer et al., 2009). Administrable par voie orale, il réduit la croissance tumorale *in vivo* sans toxicité évidente pour l'animal (French et al., 2006).

Plus récemment, un inhibiteur considéré comme spécifique de la SphK2, le composé ABC294640, a été identifié (French et al., 2010). Ce compétiteur du site de liaison de la sphingosine inhibe la prolifération et la migration *in vitro*. De plus, il est oralement administrable, et des études chez l'animal ont mis en évidence qu'il diminue la croissance tumorale en induisant l'autophagie dans des modèles de cancer du sein et du rein (Beljanski et al., 2010; French et al., 2010).

Plusieurs composés naturels, principalement isolés à partir de micro-organismes bactériens ou fongiques ont été décrits comme des inhibiteurs des SphKs *in vitro* (Table 3). Le B-5354c, un inhibiteur non-compétitif pour la fixation de la sphingosine, ne montre notamment aucune d'activité envers la PI3K ou la PKC (Kono et al., 2002). Il est capable d'induire une chimiosensibilisation à la fois *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de cancer de la prostate (Pchejetski et al., 2008). Le F-12509A est un inhibiteur compétitif du site de liaison de la sphingosine et induit l'apoptose de cellules leucémiques chimiorésistantes (Bonhoure et al., 2008; Bonhoure et al., 2006; Kono et al., 2002).

La S1P est une molécule très attractive et originale pour la thérapie antitumorale, bien que sa nature lipidique rende son ciblage plus difficile. Néanmoins, des outils très puissants ont récemment été développés : il s'agit d'anticorps anti-lipide hautement spécifiques de la S1P (O'Brien et al., 2009; Visentin et al., 2006). Ils fonctionnent comme des « éponges moléculaires » et neutralisent la S1P circulante dans le sang et les autres compartiments extracellulaires. Deux anticorps anti-S1P ont été produits à ce jour : le Sphingomab™, un anticorps monoclonal murin, et sa version humanisée, le sonenpizumab (ANOSEP™). Ils inhibent la prolifération cellulaire et la protection de l'apoptose induites par la S1P, mais également la migration des cellules endothéliales et la formation de vaisseaux sanguins en réponse au VEGF ou au bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), vraisemblablement en bloquant la transactivation des S1PRs et des récepteurs à ces facteurs de croissance. De plus, ils inhibent la production de VEGF et des cytokines IL-6 et IL-8 par les cellules tumorales *in vitro* (Visentin et al., 2006). Leurs effets anti-angiogéniques et anti-tumoraux ont

également été décrits *in vivo*. Le sonenpcizumab a fait l'objet d'un essai clinique de phase I pour le traitement de diverses tumeurs solides, et de phase II pour les carcinomes rénaux.

De nombreux composés ciblent les S1PRs. En particulier, des antagonistes du S1P₁ et du S1P₃ peuvent être intéressants dans le traitement du cancer, vu leurs rôles dans la régulation de la prolifération, de la migration, de l'invasion, de l'angiogenèse, et leurs interactions croisées avec d'autres récepteurs (cf. 3.1 et 3.3.1.1). Notamment, le VPC23019 est un antagoniste du S1P₁ et du S1P₃ *in vitro* (Davis et al., 2005a). Cependant, l'efficacité thérapeutique antitumorale de tels antagonistes reste à être démontrée. Notamment, l'expression ubiquitaire du S1P₁ et ses rôles dans la perméabilité vasculaire et le trafic lymphocytaire sont importants à prendre en considération.

Le FTY720 (ou fingolimod) est une pro-drogue analogue de la sphingosine ayant de nombreux effets anti-tumoraux (Table 3). Il est absorbé par les cellules où il est phosphorylé en FTY720-phosphate (FTY720-P) par la SphK2⁹ avant d'être relargué par des mécanismes peu décrits à ce jour (Sanchez et al., 2003). Il peut notamment être pris en charge par le transporteur Spns2, qui permet l'export de la S1P (Hisano et al., 2011). Le FTY720-P est décrit comme un antagoniste fonctionnel du S1P₁, du S1P₃, du S1P₄ et du S1P₅. Il induit rapidement la polyubiquitination, l'endocytose, et la dégradation du S1P₁ par le protéasome (Galer and Goetzl, 2004). *De facto*, il a une action immunosuppressive : en induisant la dégradation du S1P₁ dans les lymphocytes, il bloque leur sortie des organes lymphoïdes provoquant une lymphopénie (Mandala et al., 2002). Le FTY720 a également des effets inhibiteurs sur la phospholipase A2 (PLA2), la SphK1, la SPL et la CerS, alors qu'il active la PP2A (Bandhuvula et al., 2005; Lahiri et al., 2009; Matsuoka et al., 2003; Neviani et al., 2007; Payne et al., 2007; Vessey et al., 2007). Le FTY720-P a une action inhibitrice sur l'autotaxine, diminuant les taux plasmatiques de LPA (van Meeteren et al., 2008). *In vivo*, le FTY720 induit l'apoptose dans des cellules de cancer de la prostate, du sein, de la vessie, ou leucémiques. Il réduit également la vascularisation tumorale, l'angiogenèse ou encore le processus métastatique (Azuma et al., 2003a; Azuma et al., 2003b; Azuma et al., 2002; LaMontagne et al., 2006; Wang et al., 1999b).

3.3.2. Inflammation et immunité

Les rôles des SphKs dans l'inflammation et l'immunité ont été largement étudiés. La plupart des études se sont concentrées sur la SphK1 et son rôle pro-inflammatoire. La SphK1 peut être induite de façon transcriptionnelle ou activée de façon post-traductionnelle par de nombreuses molécules pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'interleukine IL-1 β ou encore l'interféron- γ (Billich et al., 2005; Snider et al., 2010; Xia et al., 1998). De plus, elle module les fonctions de nombreuses cellules immunitaires au cours de la réponse inflammatoire (Snider et al., 2010). La SphK1 est notamment impliquée dans la circulation des lymphocytes, la migration des monocytes, le chimiotactisme des macrophages et des neutrophiles ou encore la dégranulation des mastocytes (Spiegel and Milstien, 2011).

⁹ Le FTY720 peut également être phosphorylé de façon moindre par la SphK1 (Kharel et al., 2005).

La régulation de la réponse inflammatoire par la SphK2 est plus controversée. Certaines études suggèrent qu'elle réduit l'inflammation. Il a été démontré dans un modèle de xéno greffe de cancer du sein que la déficience pour la SphK2 augmente la production de cytokines pro-inflammatoires et la réduction de l'IL-10, interleukine anti-inflammatoire, coïncidant avec une diminution de la croissance tumorale (Weigert et al., 2009). D'autres études rapportent que l'inhibition pharmacologique de la SphK2 induit des effets anti-inflammatoires dans des modèles murins de rectocolite ulcéreuse, de maladie de Crohn ou d'arthrite inflammatoire (Fitzpatrick et al., 2011; Maines et al., 2008; Maines et al., 2010), suggérant que la SphK2 ait une action pro-inflammatoire.

La S1P et le S1P₁ ont été décrits comme reliant l'inflammation intestinale chronique au cancer du côlon en déclenchant notamment l'activation du facteur de transcription NF-κB et STAT3 par l'intermédiaire d'une boucle d'amplification maligne (Lee et al., 2010; Liang et al., 2013).

La voie SphKs/S1P est intimement liée à la fonction des lymphocytes (Spiegel and Milstien, 2011). L'expression du S1P₁ par ces cellules est notamment cruciale pour induire ou non leur sortie des tissus lymphoïdes (Matloubian et al., 2004). L'expression de CD69 (*Cluster of Differentiation 69*) par les thymocytes immatures induit la dégradation du S1P₁, les retenant dans le thymus afin d'y être sélectionnés. L'augmentation de l'expression du facteur de transcription KLF2 (*Krüppel-like Factor 2*) permet de stabiliser celle du S1P₁, rendant les lymphocytes T naïfs sensibles à la S1P produite par les cellules périvasculaires entourant le thymus (Takada et al., 2011). Les lymphocytes T quittent alors le thymus et rencontrent l'endothélium vasculaire où ils répondent à la forte concentration en S1P et gagnent la circulation sanguine. De façon similaire, le passage des lymphocytes B dans le compartiment vasculaire de la moelle osseuse et le sang périphérique dépend de l'expression du S1P₁ (Allende et al., 2010).

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune chronique du système nerveux central caractérisée par la démyélinisation des neurones. Les cellules dendritiques sont des acteurs centraux des réponses immunitaires et sont impliquées dans le maintien de la tolérance périphérique. Des cellules dendritiques présentatrices d'antigène anormalement activées sont retrouvées chez des patients souffrant de SEP, entraînant une perte partielle de l'efficacité de la tolérance immunitaire. Ceci favorise l'expansion clonale de lymphocytes T activés par réactivité croisée avec des antigènes du soi dans les nœuds lymphatiques. La nature de l'antigène, les signaux co-stimulateurs et les cytokines présentes induisent la différenciation en lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires (T_H), régulateurs (T_{Reg}) ou en lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques. Les cellules autoréactives recirculent dans le sang et pénètrent la barrière hémato-encéphalique pour envahir le système nerveux central, où ils seront réactivés, subissent une expansion clonale et différenciés de façon terminale par les antigènes du soi présentés par les cellules dendritiques. La présence de lymphocytes autoréactifs T_H, cytotoxiques, ou des plasmocytes (lymphocytes B activés producteurs d'anticorps) dans le système nerveux central associée à une activation anormale des astrocytes et de la microglie conduisent à une production importante de cytokines pro-inflammatoires, d'espèces réactives de l'oxygène,

d'anticorps du soi et à une forte toxicité cellulaire. Ces processus conduisent à la démyélinisation neuronale et aux dommages sur les nerfs et la barrière hémato-encéphalique constatés chez les patients souffrant de SEP (Brinkmann et al., 2010).

Les propriétés immunosuppressives du fingolimod (FTY720) ont été décrites lors d'expériences de greffes d'organes, l'utilisation de ce composé réduisant les réactions de rejet (Brinkmann et al., 2010). Le fingolimod réduit le nombre de lymphocytes B et T périphériques en augmentant notamment leur rétention dans les nœuds lymphatiques (Allende et al., 2010; Chiba et al., 1998; Graler and Goetzl, 2004; Kabashima et al., 2006; Matloubian et al., 2004). Une dose quotidienne de 0,1-0,3 mg/kg de fingolimod est très efficace pour inhiber le développement d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, un modèle animal de SEP (Brinkmann et al., 2002; Foster et al., 2007). De nombreuses données ont ainsi suggéré que le fingolimod ait une action bénéfique dans le traitement de maladies auto-immunes et neurodégénératives. Plusieurs essais cliniques ont alors évalué l'effet du fingolimod dans la SEP et ont conclu à une efficacité supérieure au traitement notamment par l'interféron- β 1a (Brinkmann et al., 2002). Le fingolimod (Gilenya™) a été approuvé par les agences américaine *Food and Drug Administration* (FDA) et européenne du médicament (EMA) pour le traitement de la SEP. Ses effets secondaires sur le système cardiovasculaire, notamment une bradycardie ou une arythmie, font l'objet d'une surveillance par la FDA et l'EMA.

3.3.3. Système cardiovasculaire et athérosclérose

L'athérosclérose est une condition inflammatoire chronique caractérisée par l'accumulation notamment de lipides et de cellules immunitaires sous forme de plaques au niveau de l'endothélium vasculaire induisant une réduction de la lumière artérielle et une thrombose après rupture de la plaque. La forte concentration de la S1P circulante, principalement sous forme liée aux HDL (*High Density Lipoprotein*), a soulevé son intérêt dans la pathogenèse de l'athérosclérose (Daum et al., 2009). La S1P a divers effets sur de nombreux types cellulaires ou des processus impliqués dans le développement de la maladie. Elle régule par exemple la migration des monocytes, la prolifération des cellules musculaires lisses, le tonus vasculaire ou la réponse inflammatoire, comme vu précédemment (Maceyka et al., 2012). Cependant, les effets de la S1P dans l'athérosclérose sont complexes. Il apparaît qu'une signalisation médiée par le NF- κ B et le S1P₃ antagoniserait une autre voie impliquant le S1P₁. Les souris double KO *APOE*^{-/-} (*Apolipoprotein E*) / *S1P3*^{-/-} ne présentent pas de diminution de lésions athérosclérotiques ni du contenu lipidique aortique, mais une réduction significative de la présence de macrophages et de cellules musculaires lisses (Keul et al., 2011). L'inhibition pharmacologique ou la déplétion génique du S1P₂ dans des souris *APOE*^{-/-} atténue la formation de lésions athérosclérotiques, ces effets étant imputés à une réduction de la rétention et/ou de la transmigration des macrophages, et de la production de cytokines pro-inflammatoires (Skoura et al., 2011; Wang et al., 2010b). De plus, une étude récente a montré que la S1P liée aux HDL était exclusivement liée à l'apolipoprotéine M (ApoM), connue pour avoir des effets anti-athérogéniques (Christoffersen et al., 2011). De façon intéressante, l'effet vasculoprotecteur de

l'ApoM passe par la délivrance de S1P au S1P₁ dans les cellules endothéliales. Le fingolimod réduit de façon marquée les lésions athérosclérotiques dans des souris *APOE*^{-/-} via certainement ses effets lymphopénique et anti-inflammatoire (Maceyka et al., 2012).

3.3.4. Diabète et obésité

Le métabolisme sphingolipidique est altéré en conditions diabétiques. La stimulation *de novo* de céramide est impliquée dans la résistance à l'insuline, alors que l'inhibition de la synthèse des sphingolipides augmente sa sensibilité et prévient l'apparition du diabète chez le rongeur obèse (Deevska and Nikolova-Karakashian, 2011; Summers, 2010). La réponse inflammatoire dans l'obésité exacerbe la résistance à l'insuline et le développement du diabète. Une étude récente a impliqué que l'activation du TLR4 (*Toll-Like Receptor 4*) induit une augmentation de la production de céramide via IKK β (*Inhibitor of NF- κ B Kinase β*) et NF- κ B (Holland et al., 2011a). Une autre étude a récemment lié l'adiponectine, une cytokine produite par les adipocytes, et le métabolisme du céramide dans la sensibilité à l'insuline (Holland et al., 2011b). L'adiponectine stimule les CDases et la formation de S1P. Les niveaux plasmatiques de S1P sont élevés dans deux modèles animaux de diabète de type 1 (diabète induit par la streptozotocine chez le rat et souris diabétique *Ins2 Akita*) (Fox et al., 2011). Un antagoniste du S1P₂ prévient l'établissement du diabète dans un modèle murin de la maladie induite par la streptozotocine, et les souris *S1P2*^{-/-} présentent une faible glycémie, une réduction de l'apoptose des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, et un fort ratio insuline/glucose (Imasawa et al., 2010). Le glucose induit une augmentation rapide et soutenue de l'activité SphK dans les îlots de Langerhans qui semble partiellement médier en réponse la croissance des cellules β pancréatiques. Les mécanismes moléculaires des rôles de la S1P sur la prolifération et la survie de ces cellules sont toutefois inconnus à ce jour notamment quant à l'implication des S1PRs ou de cibles intracellulaires.

Problématique

Longtemps considérés comme de simples composants structuraux des membranes cellulaires, les sphingolipides ont émergé comme les représentants d'une nouvelle classe de lipides bioactifs impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques fondamentales comme la prolifération et la survie cellulaire, l'apoptose, la migration ou encore la réponse inflammatoire (Maceyka et al., 2012). Deux métabolites sphingolipidiques, le céramide et la S1P sont largement impliqués dans le développement tumoral. Le céramide est un médiateur antiprolifératif et pro-apoptotique, alors que la S1P est un facteur de prolifération et de survie cellulaire. Les effets opposés de ces deux sphingolipides ont ainsi conduit au concept que la balance entre céramide et S1P module le devenir cellulaire (Cuvillier et al., 1996). Cet équilibre — appelé biostat céramide/S1P — est régulé par plusieurs enzymes dont les SphKs qui catalysent la phosphorylation de la sphingosine, catabolite direct du céramide, en S1P (Cuvillier et al., 2010; Pitson, 2011). La S1P peut agir de manière autocrine ou paracrine par l'interaction avec une famille de cinq récepteurs couplés aux protéines G (S1P₁₋₅) pour moduler notamment la prolifération, la survie, la migration et la survie cellulaire (Chun et al., 2010; Maceyka et al., 2012). Il est également établi que la S1P agit de façon intracellulaire, et l'identification récente de cibles de cette signalisation a dévoilé de nouveaux rôles dans la régulation épigénétique de la transcription (Hait et al., 2009), de l'apoptose ou encore dans la modulation de la réponse inflammatoire (Alvarez et al., 2010).

De nombreuses études ont montré que la dérégulation de la balance sphingolipidique en faveur de la S1P favorise l'initiation et la progression tumorale mais également l'invasion et le processus métastatique (Cuvillier et al., 2010; Ponnusamy et al., 2012; Visentin et al., 2006). Par ailleurs, la surexpression de la SphK1 dans des fibroblastes induit leur transformation et leur capacité à former des tumeurs chez la souris *scid* (Xia et al., 2000). La surexpression de l'ARNm, de la protéine et l'augmentation de l'activité enzymatique de la SphK1 ont été rapportées dans de nombreuses tumeurs solides dont le cancer de la prostate (Cuvillier et al., 2010). Des travaux réalisés dans mon équipe d'accueil ont montré l'importance de la voie SphKs/S1P dans l'établissement et le développement du cancer de la prostate (Cuvillier et al., 2010). Notre équipe a également réalisé une étude clinique montrant une corrélation entre la surexpression de la SphK1 et l'agressivité du cancer de la prostate et la récurrence après prostatectomie (Malavaud et al., 2010). De plus, plusieurs études montrent une corrélation inverse entre la surexpression de la SphK1 et la survie des patients dans le glioblastome (Van Brocklyn et al., 2005), le cancer du sein (Ruckhaberle et al., 2008), de l'estomac (Li et al., 2009) ou encore du cancer du poumon à petites cellules (Song et al., 2011).

La prolifération et la survie des cellules d'un organisme sont régies par le cycle cellulaire. Ce cycle comprend deux phases de croissance cellulaire (G1 et G2) espacées par une phase de duplication du matériel génétique (S) et qui aboutissent à une phase de division, la mitose (M).

La mitose est une succession de phases qui assure la division du génome et des constituants d'une cellule dite « mère » en deux cellules « filles ». De profonds remodelages de l'architecture cellulaire sont opérés pour assurer ces fonctions avec parmi eux l'assemblage d'un fuseau mitotique de microtubules à partir des centrosomes. Les premières étapes de la mitose — la prophase, la prométaphase et la métaphase — préparent la séparation du génome de la cellule en deux parties. En prométaphase, le fuseau mitotique capture les chromosomes au niveau de leurs kinétochores, les aligne en une plaque métaphasique avant de les séparer en anaphase en deux lots identiques de chromatides sœurs pour former les futurs noyaux des deux cellules « filles ». Ces processus sont cruciaux pour la qualité de la ségrégation chromosomique et sont soumis à un point de contrôle mitotique, le *Spindle Assembly Checkpoint* (SAC) (Musacchio and Salmon, 2007). Une fois le génome séparé, un anneau contractile vient cliver le cytoplasme en télophase pour former et séparer les deux cellules « filles » en fin de cytokinèse.

La perturbation du processus de ségrégation chromosomique peut conduire à la génération de cellules « filles » possédant un nombre anormal de chromosomes. L'altération de la diploïdie du caryotype — ou aneuploïdie — peut favoriser l'apparition d'instabilité chromosomique (Holland and Cleveland, 2012). Ces deux notions, aneuploïdie et instabilité chromosomique, sont caractéristiques des cellules cancéreuses et une source de variation génétique contribuant à l'initiation et la prolifération tumorale et à l'adaptation tumorale aux stress environnementaux (hypoxie, inflammation, stress métabolique) (Holland and Cleveland, 2012; Pihan et al., 2003; Potapova et al., 2013). De plus, l'aneuploïdie et l'instabilité chromosomique sont associées à un mauvais pronostic et à une résistance thérapeutique dans de nombreux cancers (Choi et al., 2009; Heilig et al., 2010; McClelland et al., 2009; Pihan et al., 2003; Swanton et al., 2009).

Les SphKs sont impliquées dans la régulation de la prolifération et de la survie cellulaire (Maceyka et al., 2012). Des données de la littérature proposent que les SphKs pourraient moduler la progression dans la phase G1 du cycle cellulaire par un mécanisme impliquant la protéine p21 (Gao and Smith, 2011; Hait et al., 2009). Il a également été mis en évidence que les SphKs sont localisées au niveau des centrosomes au cours de la mitose, suggérant qu'elles puissent participer à la régulation de ce processus (Gillies et al., 2009). Enfin une récente étude a proposé que la SphK1 intervienne dans la cytokinèse mais ces résultats restent à être confirmés (Kotelevets et al., 2012). Cependant, le rôle des SphKs dans le contrôle de la mitose est à ce jour inexploré.

Mes travaux de thèse visent à décrire le rôle des SphKs dans la régulation de la mitose ainsi que de préciser les mécanismes moléculaires impliqués. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'implication des SphKs dans le contrôle de la progression mitotique ainsi que de la ségrégation chromosomique et leurs conséquences.

Résultats expérimentaux

Matériels et méthodes

1. Lignées et culture cellulaire

La lignée cellulaire HeLa (*Henrietta Lacks*) est issue d'une métastase d'un adénocarcinome humain de l'utérus (Gey GO, 1952). Les cellules HeLa ont été cultivées dans du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) supplémenté en 10% sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF).

La lignée RPE1 (*Retinal Pigment Epithelial cells*) dérive de l'immortalisation de la lignée normale RPE-340 par l'induction de l'expression de la hTERT (*human Telomerase Reverse Transcriptase*) (Bodnar et al., 1998). Pour leur culture, le DMEM 10% SVF a également été supplémenté en Ham's F-12 10% SVF (1:1).

La lignée PC-3 dérive d'une métastase osseuse d'un adénocarcinome prostatique. Elle a été cultivée dans du RPMI 1640 supplémenté en 10% SVF.

La lignée CAKI-1 a été établie à partir d'une métastase de peau d'un carcinome à cellules claires. Elle a également été cultivée dans du RPMI 1640 supplémenté en 10% SVF.

La lignée primaire HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cell*) dérive de l'endothélium veineux du cordon ombilical. Elles ont été cultivées dans du milieu EBM-2 (*Endothelial Basal Medium-2*) supplémenté en facteurs de croissance et 2% SVF et sur des boîtes de Pétri recouvertes de gélatine.

Toutes les lignées cellulaires ont été maintenues dans une atmosphère humide à 37°C et 5% CO₂.

2. Réactifs

Les inhibiteurs de la SphK1 SKI (French et al., 2003) et PF-543 (Schnute et al., 2012), l'inhibiteur de Cdk1 RO3306 (Vassilev et al., 2006), l'inhibiteur de MEK U0126, ainsi que les inhibiteurs de PI3Ks LY294002 et wortmanine ont été fournis par Calbiochem.

Le VPC23019, antagoniste des S1P₁ et S1P₃, a été fourni par Avanti Polar Lipids.

Le JTE-013, antagoniste du S1P₂, a été fourni par Tocris (R&D).

La S1P et la sphingosine ont été fournies par Enzo.

L'anticorps anti-S1P ou Sphingomab™ (LT1002), et l'anticorps de même isotype contrôle (LT1017) ont été fournis par le Dr. Roger Sabbadini (Lpath) (Visentin et al., 2006).

L'ATP, le nocodazole, le taxol et la thymidine ont été fournis par Sigma.

3. Anticorps

La table 4 ci-dessous résume les divers anticorps et leurs conditions d'utilisation au cours de cette étude.

Table 4. Anticorps et conditions d'utilisation

Anticorps	Fournisseur	Conditions d'utilisation
Primaires		
Actine	Sigma (A3853)	Western blot (1:5000)
BubR1	Santa Cruz (sc-47744)	Immunofluorescence (1:500)
CREST	Hôpital de Strasbourg	Immunofluorescence (1:500)
Cycline B1	Santa Cruz (sc-245)	Western blot (1:1000)
Phospho-Erk1/2	Cell Signaling (#4370)	Western blot (1:2000)
Erk1/2	Cell Signaling (#9102)	Western blot (1:1000)
Flag	Sigma (Clone M2)	Western blot (1:1000)
GFP	Abcam (ab290)	Western blot (1:5000)
H3 ^{S10P}	Abcam (ab5176)	Western blot (1:1000), FACS (1:1000)
Mad2	Santa Cruz (sc-374131)	Immunofluorescence (1:500)
S1P ₁	Novus (NBP1-95141)	Western blot (1:10 000)
S1P ₂	Sigma (HPA014307)	Western blot (1:1000)
S1P ₃	Abcam (ab74477)	Western blot (1:1000)
S1P ₄	Abcam (ab126392)	Western blot (1:1000)
S1P ₅	Abcam (ab92994)	Western blot (1:1000)
SphK1	Stuart Pitson	Western blot (1:5000)
SphK2	Stuart Pitson	Western blot (1:5000)
α -tubuline	Santa Cruz (sc-32293)	Immunofluorescence (1:1000) , Western blot (1:5000)
Secondaires		
Alexa-488	Jackson Lab	Immunofluorescence (1:1000)
Cy3	Jackson Lab	Immunofluorescence (1:1000)
Cy5	Jackson Lab	Immunofluorescence (1:1000)
HRP (Souris et Lapin)	Biorad	Western blot (1:5000)
Texas Red	Jackson Lab	Immunofluorescence (1:1000)

4. Synchronisation des cellules

Les cellules ont été synchronisées en fin de phase G2 par 10 μ M de RO3306 pendant 16h (Vassilev et al., 2006). Alternativement, les cellules ont été synchronisées en phase S par un double bloc thymidine comme suit : un premier bloc thymidine 2 mM a été réalisé pendant 16 h, puis les cellules ont été lavées et relarguées en milieu sans thymidine pendant 8 h avant de subir un second bloc thymidine 2 mM pendant 16 h supplémentaires. Les cellules ont ensuite été relarguées pendant les temps indiqués en milieu sans thymidine pour permettre leur progression dans le cycle cellulaire. Les synchronisations en prométaphase ont été réalisées par un traitement au nocodazole à 0,2 μ g/ml pendant 16h. Pour les synchronisations en métaphase, les cellules ont d'abord subi une synchronisation en fin de G2 par le RO3306 comme décrit plus haut, et ont ensuite été relarguées en

présence de l'inhibiteur du protéasome, le MG132 à 2 μM pendant les temps indiqués. Si mentionné, les cellules ont ensuite été lavées et relarguées pendant les temps indiqués pour permettre leur progression dans le cycle cellulaire.

5. Transfection d'ARN interférent

Les cellules ont été transfectées de façon transitoire avec des siRNA dont les séquences sont indiquées dans la table suivante (Table n°5).

Table 5. Séquence des siRNA utilisés

ARNm cible	Séquence sens 5'–3'	Concentration finale utilisée
scramble	Eurogentec	20 nM ou 50 nM
SphK1	GGGCAAGGCCUUGCAGCUC	20 nM ou 50 nM
SphK2	CAAGGCAGCUCUACACUCA GAGACGGGCUGCUCCAUGA GCUCCUCCAUGGCGAGUUU CCACUGCCCUCACCUUGUCU	20 nM ou 50 nM
S1P ₂	CUCUCUACGCCAAGCAUUA	50 nM
S1P ₄	CUGGUGAACAUACGCUGA	50 nM
S1P ₅	GAAGGACCUUGUGGGUGAU	50 nM

Les transfections de siRNA ont été réalisées en utilisant la Lipofectamine® 2000 (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur pendant les temps indiqués. Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri de diamètre 100-mm de façon à atteindre 30-50% de confluence 24h après. Les siRNAs ont été dilués en OPTI-MEM sans sérum supplémenté en 5% glutamine (Gibco). La Lipofectamine® 2000 a également été diluée dans ce même milieu. Cinq minutes après resuspension de la Lipofectamine® 2000, elle a été mixée au siRNAs et les solutions ont été incubées pendant 20 min à température ambiante. Après rinçage au PBS, le milieu des cultures cellulaires a été remplacé par de l'OPTI-MEM sans sérum supplémenté en 5% glutamine. Les siRNAs ont été ajoutés et le milieu a été homogénéisé. Les cellules ont ensuite été replacées dans leurs conditions de culture classiques (37°C, 5% CO₂). 6h après transfection, l'OPTI-MEM a été lavé et remplacé par le milieu de culture standard des cellules. L'efficacité de la déplétion a ensuite été évaluée par Western blot 48h après transfection.

6. Plasmides et transfection d'ADN plasmidique

Le plasmide GFP-SphK1 a été construit en insérant l'ADN complémentaire de la SphK1 humaine dans un vecteur pEGFP-C2. Brièvement, nous avons isolé le cDNA de la SphK1 en digérant un

plasmide le contenant (fourni par Dr. Stuart Pitson). L'insert a ensuite été amplifié par PCR en ajoutant les sites de restriction pour son clonage dans le nouveau plasmide puis séquencé par Millegen. Le cDNA validé a ensuite été ligué dans un vecteur pEGFP-C2. Les plasmides formés ont à nouveau été validés par séquençage (Millegen).

Le plasmide GFP-SphK2 a été fourni par GeneCopoeia/OriGene.

Les transfections transitoires d'ADN plasmidique ont été effectuées utilisant le JetPEI (Polyplus Transfection) selon les instructions du fournisseur. Les cellules ont étéensemencées dans le support adapté à l'expérience de façon à atteindre 50-60% de confluence 24h après. Pour la transfection, les plasmides et le JetPEI ont été resuspendus dans du NaCl 150 mM stérile. Le JetPEI a été ajouté aux plasmides puis les solutions ont été vortexées pendant 10 s et incubées 15 min à température ambiante. Pendant ce temps, le milieu de culture a été renouvelé. Les plasmides ont ensuite été ajoutés goutte-à-goutte et les milieux homogénéisés avec précaution. Les cellules ont ensuite été replacées dans leurs conditions de culture classiques (37°C, 5% CO₂). L'expression des différentes protéines codées par les plasmides transfectés a été analysée 48h après par Western blot.

7. Western blot

Après lavages avec du PBS froid, les cellules ont été récupérées par grattage ou, si indiqué, seules les cellules mitotiques ont été isolées par shake-off. Les cellules sont ensuite centrifugées à 400 × *g* pendant 3 min à 4°C. Les culots cellulaires ont ensuite été lysés dans les tampons et les conditions appropriées. Pour la détermination de l'expression des SphKs, les cellules sont lysées dans un tampon « SphKs » (Tris/HCl pH 7,4 20 mM, glycérol 20%, β-mercaptoéthanol 1 mM, EDTA 1 mM, NaF 15 mM, 4-déoxyypyrodoxine 0,5 mM, β-glycérophosphate 40 mM, Na₃VO₄ 1 mM) complétement en PMSF 1 mM et en cocktail d'inhibiteurs de protéases 1% (Sigma, #P3840) extemporanément.

Pour l'analyse de l'expression des S1PRs, les cellules ont été lysées dans le tampon « S1PR » (Tris/HCl pH 7,4 50 mM, NaCl 1 M, EDTA 100 mM, EGTA 100 mM, Na₄P₂O₇ 15 mM, NaF 20 mM, NP-40 1%).

Pour le reste des expériences de Western blot, les cellules ont été lysées dans le tampon suivant : NaCl 120 mM, Tris/HCl pH 7,5 50 mM, NP-40 1%, supplémenté en PMSF 1 mM, cocktail d'inhibition de protéases 1%, NaF 5 mM et Na₃VO₄ 1 mM extemporanément.

Les lyses ont été effectuées sur roue à 4°C pendant 30 min. Les lysats ont ensuite été centrifugés à 16 000 × *g* pendant 10 min à 4°C et les surnagants dosés pour leur concentration en protéines en utilisant le kit « Bio-Rad Protein Assay » (Bio-Rad) basé sur la méthode de Bradford. La lecture de l'absorbance à 595 nm des échantillons a été effectuée en double et les concentrations en protéines

ont été déterminées automatiquement par le spectrophotomètre contre une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA, Euromedex).

Les échantillons contenant la même quantité de protéines ont été complétés avec de tampon de charge 5X (Tris/HCl pH 6,8 62,5 mM, SDS 2%, glycérol 20%, β -mercaptoéthanol 50 mM, bleu de bromophénol 0,1%) (1:5, v/v) et dénaturés à 95°C pendant 5 min. Alternativement, pour l'analyse de l'expression des S1PRs, les échantillons contenant 80 μ g de protéines ont été complétés avec du Laemmli Sample Buffer 2X (Bio-Rad) (1:1, v/v) et du β -mercaptoéthanol 5% sans être dénaturés à 95°C.

Les protéines ont ensuite été séparées sur gel SDS/PAGE à 90 V dans un tampon de migration (Tris/HCl pH 8,5 25 mM, glycine 250 mM, SDS 0,1%), puis transférées sur des membranes de nitrocellulose (Amersham) à 250 mA pendant 90 min dans un tampon de transfert (Tris pH 8,1-8,5 48 mM, glycine 39 mM, éthanol 20%). Les membranes ont été saturées pendant 30 min en TBS-Tween 0,1% lait 5% avant d'être incubées avec les anticorps primaires dirigés contre les protéines d'intérêt (cf. Table 4). Après lavages au TBS-Tween 0,1%, les membranes ont ensuite été incubées avec les anticorps secondaires couplés à l'HRP (*HorseRadish Peroxidase*). La révélation a été réalisée par chimioluminescence à l'aide du kit ECL RevelBlot® Plus (Ozyme).

8. Immunocytochimie

Les cellules ont été cultivées sur des lamelles en verre puis fixées 5 min en méthanol à -20°C ou 20 min en paraformaldéhyde (PFA) à température ambiante selon les expériences. Si mentionné, les cellules ont été soumises à un traitement de pré-extraction avant la fixation en Cytoskeleton Buffer (CB 2X : PIPES 20 mM, NaCl 300 mM, EGTA 10 mM, Glucose 10 mM, MgCl₂ 10 mM) – Triton X-100 0,5% pendant 1 min. Après fixation, les cellules ont été perméabilisées pendant 10 min en CB – Triton X-100 0,2% puis saturées pendant 30 min en CB – Triton X-100 0,02%, SVF 2%. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 1 h avec les anticorps primaires dilués en CB – Triton X-100 0,02%, SVF 2%, lavées, puis incubées avec les anticorps secondaires couplés à des fluorochromes pendant 1 h supplémentaire. Si nécessaire, les cellules ont été brièvement incubées avec du 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 300 nM pour marquer l'ADN avant d'être montées sur lame en présence de milieu de montage (Dako).

9. Microscopie confocale et vidéomicroscopie

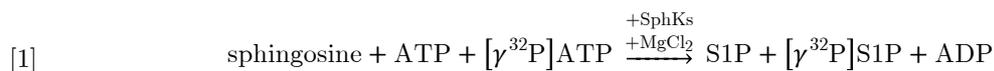
L'acquisition des images a été effectuée sur un microscope confocal laser FV1000 (Olympus) équipé d'un objectif 60X/1,4. Si mentionné, des acquisitions en z ont été réalisées avec un pas de 0,3 μ m pour imager toute la hauteur de la cellule.

Pour les expériences de vidéomicroscopie, les cellules ont étéensemencées dans une chambre de culture Lab-Tek II en plastique placée dans une enceinte humide maintenue à 37°C et 5% CO₂

montée sur le microscope. Les acquisitions ont été réalisées sur un microscope inversé DMIRB (Leica) équipé d'une caméra CoolSnap HQ². Les chambres Lab-Tek II contenant les cellules ont été placées dans une enceinte maintenue à 37°C et 5% CO₂ équipée sur le microscope. Les acquisitions ont été réalisées en lumière transmise ou également dans le canal GFP toutes les 2 min pendant 12h.

10. Dosage de l'activité enzymatique sphingosine kinase

Le principe du dosage de l'activité enzymatique sphingosine kinase repose sur la quantification de la production de S1P radiomarquée ($[\gamma^{32}\text{P}]\text{S1P}$) produite selon l'équation de réaction [1].



La $[\gamma^{32}\text{P}]\text{S1P}$ produite est séparée par chromatographie sur couche mince puis révélée par autoradiographie et quantifiée par un compteur à scintillation (Olivera and Spiegel, 1998).

Après lavages avec du PBS froid, les cellules ont été récupérées par grattage. Les cellules sont ensuite centrifugées à $400 \times g$ pendant 3 min à 4°C. Les culots cellulaires ont été lysés dans le tampon « SphKs » complet décrit précédemment en effectuant cinq cycles de congélation dans l'azote liquide—décongélation en eau à température ambiante—vortex. Les lysats ont ensuite été centrifugés à $16\,000 \times g$ pendant 20 min à 4°C et les surnagants dosés pour leur concentration en protéines comme décrit précédemment.

La réaction enzymatique a été réalisée en présence de 150 µg de protéines de lysat cellulaire, 10 µl de sphingosine à 50 mM (concentration finale : 1 mM) et 10 µl d'un mélange d'ATP à 200 mM en HEPES, d' $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ à 1 µCi (Perkin Elmer) et de MgCl₂ 400 mM dans un volume final de 180 µl. Le volume d' $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ à prélever dépend de son activité. L'activité de l' $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ a été déterminée au jour de l'expérience à l'aide de la table de décroissance du ³²P ($t_{1/2^{32}\text{P}} = 14,3$ jours) fournie par Perkin Elmer et le volume à prélever a été calculé pour obtenir une activité d'1 µCi par condition.

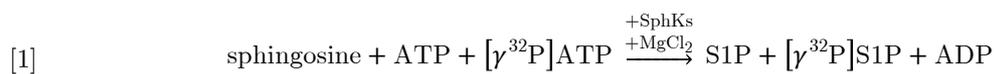
Le dosage spécifique de l'activité SphK1 *versus* l'activité SphK2 et vice versa est assurée par les conditions expérimentales de la préparation de la sphingosine (Liu et al., 2000). Après prélèvement du volume adéquat de sphingosine dissoute en éthanol, et évaporation de l'éthanol sous sorbonne, la sphingosine a été reprise en Triton X-100 5% pour le dosage de l'activité enzymatique de la SphK1, ou en BSA 100 mg/ml pour le dosage de l'activité de la SphK2, puis soniquée pendant 5 min. Dans le cas du dosage de l'activité de la SphK2, nous avons ajouté du KCl (concentration finale : 1M) au milieu réactionnel pour inhiber la SphK1.

La réaction enzymatique a été effectuée à 37°C pendant 30 min puis arrêtée par l'ajout de 20 µl d'HCl 1 N et de 800 µl de CHCl₃/CH₃OH/HCl (100:200:1). La séparation de la phase organique contenant la [γ ³²P]S1P a été réalisée par l'addition de 240 µl de CHCl₃ et 240 µl de KCl 2 N, puis un vortex et une centrifugation à 600 × g pendant 10 min. La phase organique inférieure contenant la [γ ³²P]S1P a été récupérée et évaporée sur la nuit.

Après évaporation, les échantillons ont été repris dans 40 µl de CHCl₃/CH₃OH (2:1) et déposés sur des plaques de silice G60 (VWR). La chromatographie sur couche mince a été réalisée en plaçant les plaques dans une cuve saturée en solution éluante (SphK1 : 1-butanol/méthanol/acide acétique/eau distillée ; 80:20:10:20 – SphK2 : CHCl₃/acétone/méthanol/acide acétique/eau distillée ; 10:4:3:2:1) pendant 3 h. Les plaques ont ensuite été séchées puis autoradiographiées sur la nuit. L'autoradiographie a permis de déterminer la position de la [γ ³²P]S1P sur la plaque et sa récupération par grattage de la silice. La radioactivité correspondante à chaque échantillon a ensuite été quantifiée par un compteur à scintillation en présence de liquide à scintillation. Un échantillon dépourvu d' [γ ³²P]ATP a été préparé pour servir de blanc, et un aliquot de source d' [γ ³²P]ATP a été compté pour déterminer son activité spécifique comme décrit plus bas.

L'activité enzymatique sphingosine kinase est exprimée en picomoles de [γ ³²P]S1P formées par milligramme de protéines et par minute de réaction.

Soit l'équation de réaction [1] :



Pour calculer la quantité de matière de [γ ³²P]S1P générée, il faut d'abord déterminer l'activité spécifique de l' [γ ³²P]ATP, notée $A_{\text{spec}}[\gamma^{32}\text{P}]_{\text{ATP}}$. Elle correspond au nombre de désintégrations du ³²P par unité de temps et par unité de quantité de matière. Ici, elle a été déterminée par l'équation [2].

$$[2] \quad A_{\text{spec}}[\gamma^{32}\text{P}]_{\text{ATP}} = \frac{\text{cpm}[\gamma^{32}\text{P}]_{\text{ATP}}}{n_{\text{ATP}}}$$

$$\left\{ \begin{array}{l} A_{\text{spec}}[\gamma^{32}\text{P}]_{\text{ATP}} : \text{activité spécifique de l' } [\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP (Ci} \times \text{pmol}^{-1}\text{)} \\ \text{cpm}[\gamma^{32}\text{P}]_{\text{ATP}} : \text{nombre de désintégrations de l' } [\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP par min (Ci)} \\ n_{\text{ATP}} : \text{quantité de matière d'ATP froid (pmol)} \end{array} \right.$$

La quantité de matière de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{S1P}$ formée correspond à la différence entre la quantité de radioactivité mesurée dans la silice grattée et la quantité de radioactivité du blanc divisée par l'activité spécifique de l' $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ comme décrit dans l'équation [3].

[3]

$$n_{[\gamma^{32}\text{P}]\text{S1P}} = \frac{\text{cpm}_{[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}} - \text{cpm}_{\text{blanc}}}{A_{\text{spec}}_{[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}}}$$

$$\left\{ \begin{array}{l} n_{[\gamma^{32}\text{P}]\text{S1P}} : \text{quantité de matière de } [\gamma^{32}\text{P}]\text{S1P} \text{ générée (pmol)} \\ \text{cpm}_{[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}} : \text{nombre de désintégrations de l'}[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP} \text{ par min (Ci)} \\ \text{cpm}_{\text{blanc}} : \text{nombre de désintégrations du blanc par min (Ci)} \\ A_{\text{spec}}_{[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}} : \text{activité spécifique de l'}[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP} \text{ (Ci} \times \text{pmol}^{-1}\text{)} \end{array} \right.$$

Ainsi, l'activité enzymatique sphingosine kinase, notée A_{sphK} , est déterminée par l'équation [4]. Pour rappel, elle est exprimée en picomoles de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{S1P}$ formées par milligramme de protéines et par minute de réaction.

[4]

$$A_{\text{sphK}} = \frac{n_{[\gamma^{32}\text{P}]\text{S1P}} \times \frac{1000}{m}}{t_r}$$

$$\left\{ \begin{array}{l} A_{\text{sphK}} : \text{activité sphingosine kinase (pmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}\text{)} \\ n_{[\gamma^{32}\text{P}]\text{S1P}} : \text{quantité de matière de } [\gamma^{32}\text{P}]\text{S1P} \text{ générée (pmol)} \\ m : \text{masse de protéines utilisé pour la réaction (}\mu\text{g)} \\ t_r : \text{durée de la réaction enzymatique (min)} \end{array} \right.$$

11. RT-PCR quantitative

Les ARNs totaux ont été extraits à partir de culots cellulaires à l'aide du kit RNeasy (Qiagen) selon le protocole du fournisseur. La concentration et la pureté des ARN ont été déterminées en mesurant l'absorbance à 260 nm et 280 nm par un NanoDrop (Thermo). Les cDNA ont été synthétisés par la réaction de transcription inverse à partir d' 1 μg d'ARN total à l'aide du kit Superscript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) selon le protocole fourni. La PCR quantitative a ensuite été réalisée sur un thermocycleur ABIPrism 7500 (Applied Biosystems) à l'aide du kit MESA Green qPCR MasterMix Plus (Eurogentech) selon le protocole du fabricant et à partir des couples d'amorces spécifiques des gènes ciblés (cf. Table 6). Les gènes de ménage utilisés sont l'*ARNPOLII* et *YWHAZ*. La réaction a été réalisée par une dénaturation initiale de 10 min à 95°C, suivie de 40 cycles de 15 s de

dénaturation à 95°C et de 60 s d'hybridation spécifique—élongation à 60°C. Les résultats ont été analysés par la méthode des ΔC_t et à l'aide de l'algorithme Genorm (Biogazelle).

Table 6. Séquence des amorces utilisées

Cible	Séquence sens 5'—3'	Séquence anti sens 5'—3'
S1P ₁	AAATTCCACCGACCCATGTA	AGTTATTGCTCCCGTTGTGG
S1P ₂	CACCTGGCGGTACAAAGAAT	GTCAAGTGGCAGCTGATGAA
S1P ₃	GCTTCAGGAAATGGAAGCTG	TCAGGATGCTGTGAAACTGC
S1P ₄	CTGCTCTTCACCGCCCTGGC	GAAGCCGTAGACGCGGCTGG
S1P ₅	GTGAGGTGGGAGCCATAGAA	TTGGCTGAGTCTCCCAGAGT
ARN Pol II	GCACCACGTCCAATGACAT	GTGCGGCTGCTTCATAA
YWHAZ	ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA	CCGCCAGGACAAACCAGTAT

12. Cytométrie de flux

Les cellules ont été récupérées par trypsinisation et comptées. 5×10^5 cellules ont été centrifugées à $400 \times g$ pendant 3 min à 4°C. Les culots ont ensuite été suspendus dans 250 μ l de PBS puis 750 μ l d'éthanol à 4°C ont été ajoutés goutte-à-goutte sous agitation. Les cellules ont ainsi été fixées pendant 16h à -20°C. Les culots ont été centrifugés à $400 \times g$ pendant 3 min à 4°C et réhydratés par deux cycles de lavage au PBS-BSA 1% et centrifugation à $400 \times g$ pendant 3 min à 4°C. Pour l'immunomarquage de la phosphorylation de l'histone H3 sur la S10, les cellules ont été perméabilisées 5 min en PBS-Triton X-100 0,25% à 4°C et centrifugées à $400 \times g$ pendant 3 min à 4°C. Les culots ont ensuite été incubés avec l'anticorps primaire anti-H3S10P (Abcam, 1:1000) dilué dans 50 μ l de PBS-BSA 1% sous agitation pendant 1h à température ambiante puis lavés avec 1 ml de PBS-BSA 1% et centrifugés à $400 \times g$ pendant 3 min à 4°C. Les cellules ont été par la suite incubées avec l'anticorps secondaire (1:1000) dilué dans 50 μ l de PBS-BSA 1% sous agitation et à l'obscurité pendant 1h à température ambiante puis lavées avec 1 ml de PBS-BSA 1% et centrifugés à $400 \times g$ pendant 3 min à 4°C. Pour marquer l'ADN, les cellules ont ensuite été récupérées dans 1 ml de PBS-RNase 1mg/ml et marquées à l'iodure de propidium 10 μ g/ml pendant 30 min à 37°C.

Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie de flux sur un FACSCalibur (BD Biosciences). Brièvement, la répartition des cellules dans le cycle cellulaire a été évaluée en mesurant la fluorescence de l'iodure de propidium et du marquage de la phosphorylation de l'histone H3 sur la S10.

13. Analyse statistique

Les analyses statistiques des résultats ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism 5 (GraphPad Software). A chaque fois, le test a été adapté à la nature des données à analyser (test de Student ou ANOVA). Le test utilisé est indiqué avec le degré de significativité (ns, non significatif : $p > 0,05$; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

Résultats

1. Localisation intracellulaire des SphKs en mitose

Les travaux de Gillies *et al.* montrent que les SphKs sont retrouvées au niveau des centrosomes dans des cellules mitotiques (Gillies et al., 2009). Nous avons voulu dans un premier temps approfondir l'étude de la localisation intracellulaire des SphKs au cours de la mitose.

Nous avons réalisé des expériences d'immunocytochimie pour détecter la distribution des SphKs endogènes dans des cellules HeLa en mitose. Nos résultats montrent que les SphKs sont localisées en périphérie des centrosomes et du fuseau mitotique dès les étapes précoces de la mitose (Figures 20A et B). En anaphase, les SphKs sont retrouvées au niveau du fuseau central. Enfin, en cytokinèse, elles sont localisées au niveau du corps intermédiaire (ou *midbody*). La distribution des protéines de fusion GFP-SphKs surexprimées dans des cellules mitotiques est similaire à celle des protéines endogènes (Figures 20C et D).

Ces données suggèrent que les SphKs soient associées au fuseau mitotique au cours de la mitose et qu'elles peuvent ainsi avoir une fonction en mitose en régulant son assemblage et/ou sa fonction. Nous avons donc investigué le rôle des SphKs au cours de la mitose.

2. La surexpression des SphKs réduit la durée de la prométaphase

Nous avons dans un premier temps évalué l'effet de la surexpression des SphKs sur la proportion de cellules en mitose dans une population cellulaire en culture. Cette proportion est appelée index mitotique. La surexpression des SphKs a été validée par Western blot (Figure 21A). De plus, nous avons mesuré l'activité des SphKs dans nos échantillons. La surexpression des SphKs entraîne une forte augmentation de leur activité kinase, de 60 à 80 fois dans des cellules HeLa, indiquant que les plasmides transfectés codent pour des protéines pleinement actives (Figure 21B). Pour le calcul de l'index mitotique, des cellules HeLa asynchrones ont été transfectées pendant 48h avec des plasmides codant pour la GFP seule ou les GFP-SphKs puis ont été fixées. Un marquage de l'ADN au DAPI et des microtubules par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps anti- α -tubuline nous a permis de discriminer les cellules en interphase des cellules en mitose. Pour cette analyse, seules les cellules positives à la GFP ont été comptabilisées. Nous avons mesuré que dans une population contrôle (GFP) asynchrone de cellules HeLa, environ 11% sont en mitose ($10,9 \pm 0,9$ %). La surexpression de la GFP-SphK1 ou de la GFP-SphK2 dans des cellules HeLa asynchrones réduit significativement de près de 40% l'index mitotique ($6,4 \pm 0,9$ % et $6,9 \pm 1,3$ % respectivement) (Figure 21C).

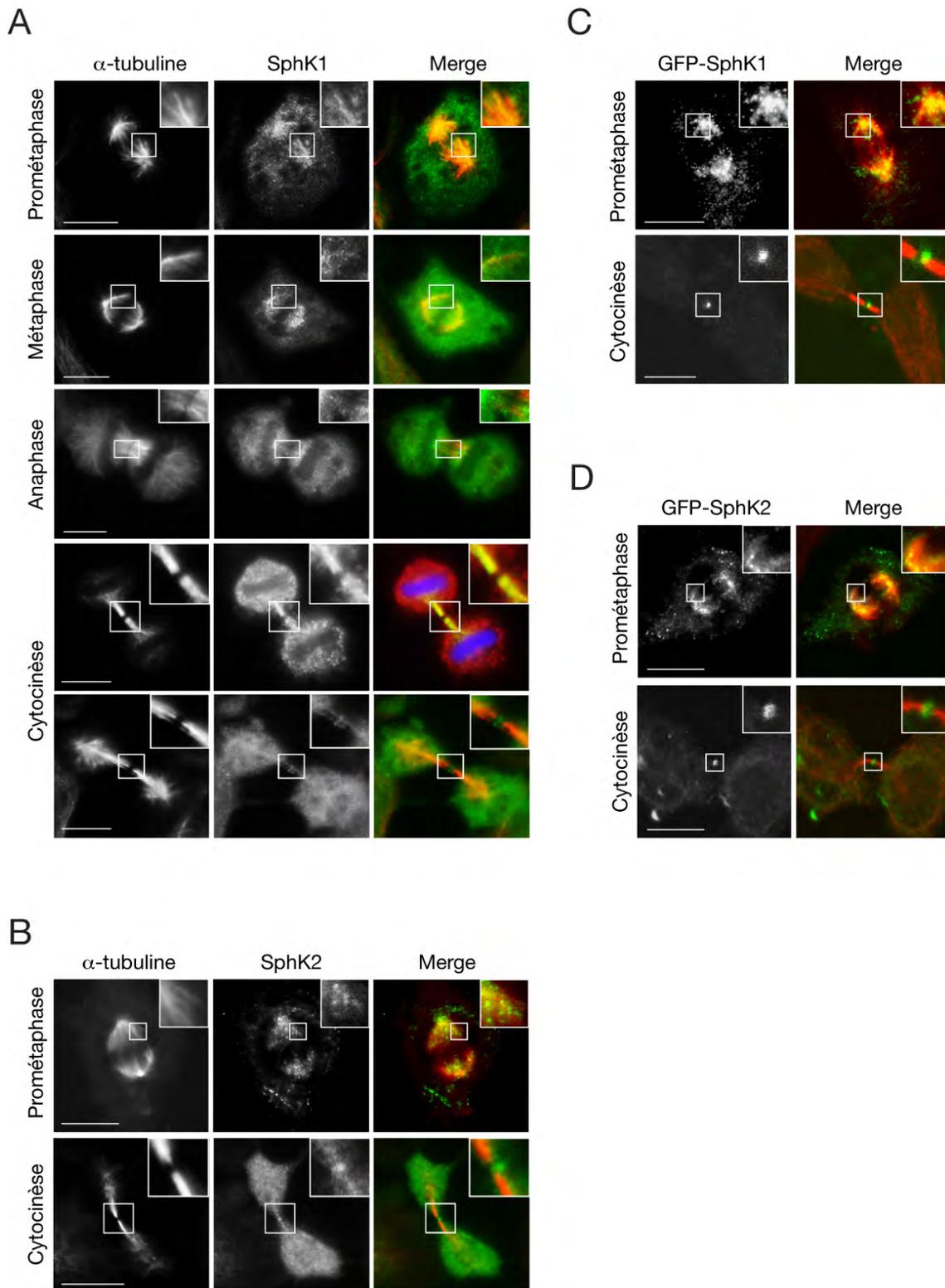


Figure 20. Localisation intracellulaire des SphKs en mitose.

(A) Images représentatives de la détection de la SphK1 endogène (vert) et de l' α -tubuline (rouge) dans des cellules HeLa par immunofluorescence. Les encarts montrent une zone agrandie de l'image. Barre d'échelle : 10 μ m. (B) Images représentatives de la détection de la SphK2 endogène (vert) et de l' α -tubuline (rouge) dans des cellules HeLa par immunofluorescence. Barre d'échelle : 10 μ m. (C) et (D) Images représentatives de la localisation des protéines de fusion GFP-SphK1 (C) et GFP-SphK2 (D) dans des cellules HeLa par immunofluorescence. Les cellules ont été transfectées pendant 48h par des plasmides codant pour la GFP seule ou les GFP-SphKs puis fixées et analysées par immunocytochimie. Barre d'échelle : 10 μ m.

Nous avons cherché à reproduire nos résultats dans une autre lignée cellulaire pour vérifier que l'effet observé ne dépend pas des cellules utilisées. Nous avons donc utilisé, et ce tout au long de notre étude en complément des cellules HeLa, la lignée RPE1 qui est un autre modèle canonique de la mitose. Cette lignée, dérivant de l'épithélium pigmenté de la rétine humaine, présente notamment l'intérêt de ne pas être cancéreuse. Nous avons donc transfecté des cellules RPE1 pendant 48h avec les plasmides codant pour la GFP ou les GFP-SphKs puis avons déterminé l'index mitotique de ces populations asynchrones comme précédemment. Nos résultats indiquent que, de façon similaire à ce que nous avons observé dans la lignée HeLa, la surexpression des SphKs dans des cellules RPE1 réduit significativement l'index mitotique en comparaison avec la population contrôle (données non montrées).

De façon similaire, nous avons également évalué la variation de l'index mitotique dans une population cellulaire HeLa enrichie en mitose par une synchronisation au nocodazole. Le nocodazole est un poison du fuseau mitotique qui inhibe la polymérisation des microtubules (Jordan and Wilson, 2004). Ainsi, il prévient l'établissement du fuseau mitotique et bloque les cellules en mitose suite à l'activation soutenue du SAC. Nous avons donc traité des cellules HeLa surexprimant la GFP ou les GFP-SphKs par le nocodazole (0,2 µg/ml) pendant 16h et avons déterminé les index mitotiques. Alors que plus de 60% des cellules contrôles (GFP) sont retrouvées en mitose après le traitement ($62,9 \pm 1,4$ %), ce pourcentage est réduit de plus de 30% pour les cellules surexprimant la GFP-SphK1 ($44,7 \pm 1,5$ %) ou la GFP-SphK2 ($41,3 \pm 1,8$ %) (Figure 21D). De même, ces données ont été confirmées dans la lignée RPE1 (données non montrées).

Ces résultats indiquent donc que la surexpression des SphKs réduit la proportion de cellules en mitose. Ceci peut s'expliquer par plusieurs hypothèses. Premièrement, suite à cette surexpression, la durée de la mitose peut être réduite. Deuxièmement, la progression dans les autres phases (G1, S ou G2) peut être affectée, arrêtant ainsi les cellules dans le cycle cellulaire. Troisièmement, ceci peut résulter d'une altération de l'entrée des cellules en mitose en conséquence notamment de l'activation d'un des points de contrôle interphasiques. Enfin, ceci peut s'expliquer par l'induction de la mort des cellules au cours de la mitose. Toutes ces hypothèses aboutissent à la diminution du nombre de cellules dans une population cellulaire, c'est-à-dire donc à une baisse de l'index mitotique.

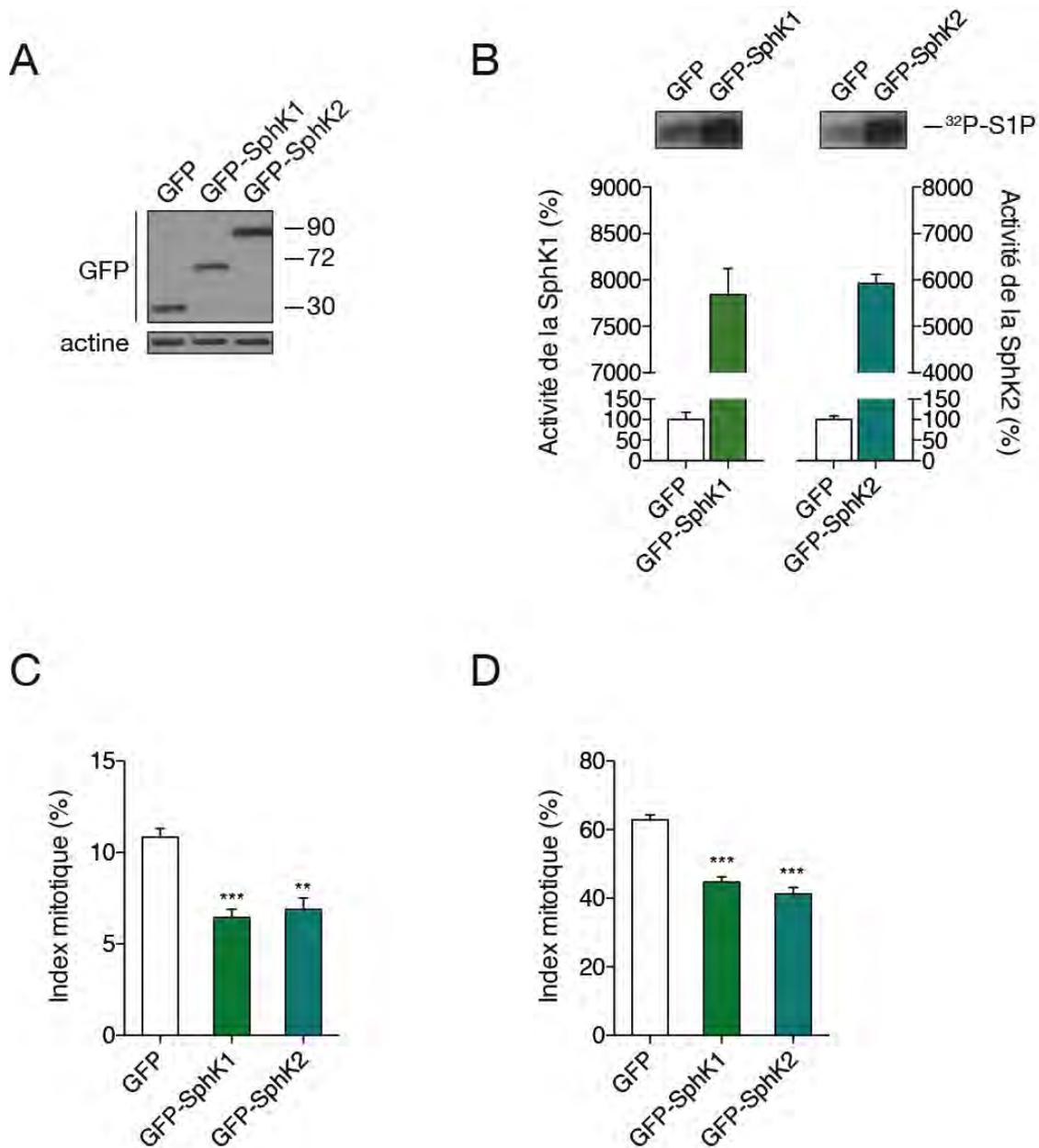


Figure 21. La surexpression des SphKs réduit l'index mitotique.

(A) Validation de la surexpression de la GFP ou des protéines de fusion GFP-SphKs par Western blot après 48h de transfection avec les différents plasmides dans des cellules HeLa. Le résultat présenté est représentatif de trois expériences indépendantes. Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.

(B) Mesure de l'activité kinase de la SphK1 et de la SphK2 dans des cellules HeLa. Les cellules ont été transfectées pendant 48h avant la mesure de l'activité kinase des SphKs. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'activité contrôle (GFP) normalisée à 100%. Les films d'autoradiographie représentant la quantité de S1P radiomarquée formée au cours du test d'activité kinase sont également montrés. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes. ***, $p < 0,001$ (test de Student).

(C) Mesure de l'index mitotique dans des cellules HeLa asynchrones surexprimant la GFP seule ou les GFP-SphKs. Les cellules ont été transfectées pendant 48h par les différents plasmides puis fixées et analysées par immunocytochimie. Seules les cellules positives pour la GFP ont été analysées. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de quatre expériences indépendantes (GFP, $n = 2490$ cellules analysées ; GFP-SphK1, $n = 2505$; GFP-SphK2, $n = 2610$). **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ (ANOVA).

(D) Mesure de l'index mitotique dans des cellules HeLa surexprimant la GFP seule ou les GFP-SphKs traitées au nocodazole. Les cellules ont été transfectées pendant 48h par les différents plasmides

puis traitées pendant 16h au nocodazole (0,2 µg/ml) avant l'évaluation de l'index mitotique. Seules les cellules positives pour la GFP ont été analysées. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de quatre expériences indépendantes (GFP, n = 2634 ; GFP-SphK1, n = 2652 ; GFP-SphK2, n = 2605). ***, $p < 0,001$ (ANOVA).

Nous avons déterminé si la surexpression des SphKs module la durée de la mitose. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de vidéomicroscopie sur des cellules asynchrones surexprimant de façon transitoire la GFP seule ou des protéines de fusion GFP-SphKs. Les acquisitions ont été réalisées toutes les deux minutes pour limiter la phototoxicité tout en étant suffisamment précis pour mesurer la durée de la mitose. Nous avons calculé la durée entre deux événements mitotiques clairement identifiables : la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEB) et la séparation des deux lots de chromatides sœurs marquant le début de l'anaphase. Cet intervalle correspond à la durée de la prométaphase et de la métaphase. Il est peu aisé de dissocier la fin de la prométaphase du début de la métaphase, surtout en vidéomicroscopie. En effet, la métaphase correspond à l'instant subtil où tous les chromosomes sont alignés dans la plaque métaphasique. À ce moment, le SAC est inactivé, les protéines assurant la cohésion des chromatides sœurs sont dégradées et les cellules entrent en anaphase. Ces événements étant extrêmement rapides, la durée de la métaphase est quasiment négligeable en comparaison avec celle de la prométaphase. C'est pour cela que nous avons choisi de décrire pour la suite la durée NEB–anaphase comme correspondant à celle de la prométaphase seulement.

La durée moyenne entre le NEB et l'entrée en anaphase dans des cellules HeLa contrôles (GFP) est de $64,5 \pm 3,1$ min. Dans des cellules surexprimant la GFP-SphK1 ou la GFP-SphK2, cette durée est significativement réduite de près de 30% ($48,6 \pm 2,4$ min et $41,2 \pm 2,4$ min respectivement) (Figures 22A et B). De même, alors que la durée moyenne NEB–anaphase est de $20,5 \pm 0,6$ min pour une population de RPE1 contrôle (GFP), on observe qu'elle diminue significativement d'environ 20% chez des cellules surexprimant la GFP-SphK1 ou la GFP-SphK2 ($16,5 \pm 0,5$ min et $17 \pm 0,5$ min respectivement) (Figure 22C). De façon importante, aucune mort en mitose n'a été observée au cours des expériences de vidéomicroscopie.

La cycline B1 est accumulée en G2 dans les cellules où elle s'associe à Cdk1 pour réguler l'entrée en mitose. Elle doit être dégradée par le protéasome à la transition métaphase-anaphase pour permettre l'achèvement de la mitose. Nous avons évalué par Western blot les niveaux de cycline B1 dans des cellules HeLa surexprimant de façon transitoire la GFP ou la GFP-SphK1 au cours de la mitose. Pour cela, les cellules ont d'abord été synchronisées à la transition G2/M par un traitement au RO3306, un inhibiteur de Cdk1, puis relarguées en mitose et récupérées à différents temps. Dans les cellules contrôles, la cycline B1 s'accumule au cours des premiers temps de relargage, atteignant un pic maximal d'expression 60 min après relargage, puis son taux diminue. En revanche, l'expression de la cycline B1 apparaît réduite d'environ 30% dans des cellules surexprimant la GFP-

SphK1 (Figure 22D). De plus, cette expression est maximale dès 30 min et diminue précocement, entre 30 et 60 min de relargage (Figure 22D). Ainsi, ces données suggèrent que ces cellules entrent plus rapidement en anaphase, ce qui concorde avec le fait que la durée de leur prométaphase est plus courte (Figures 22A–C).

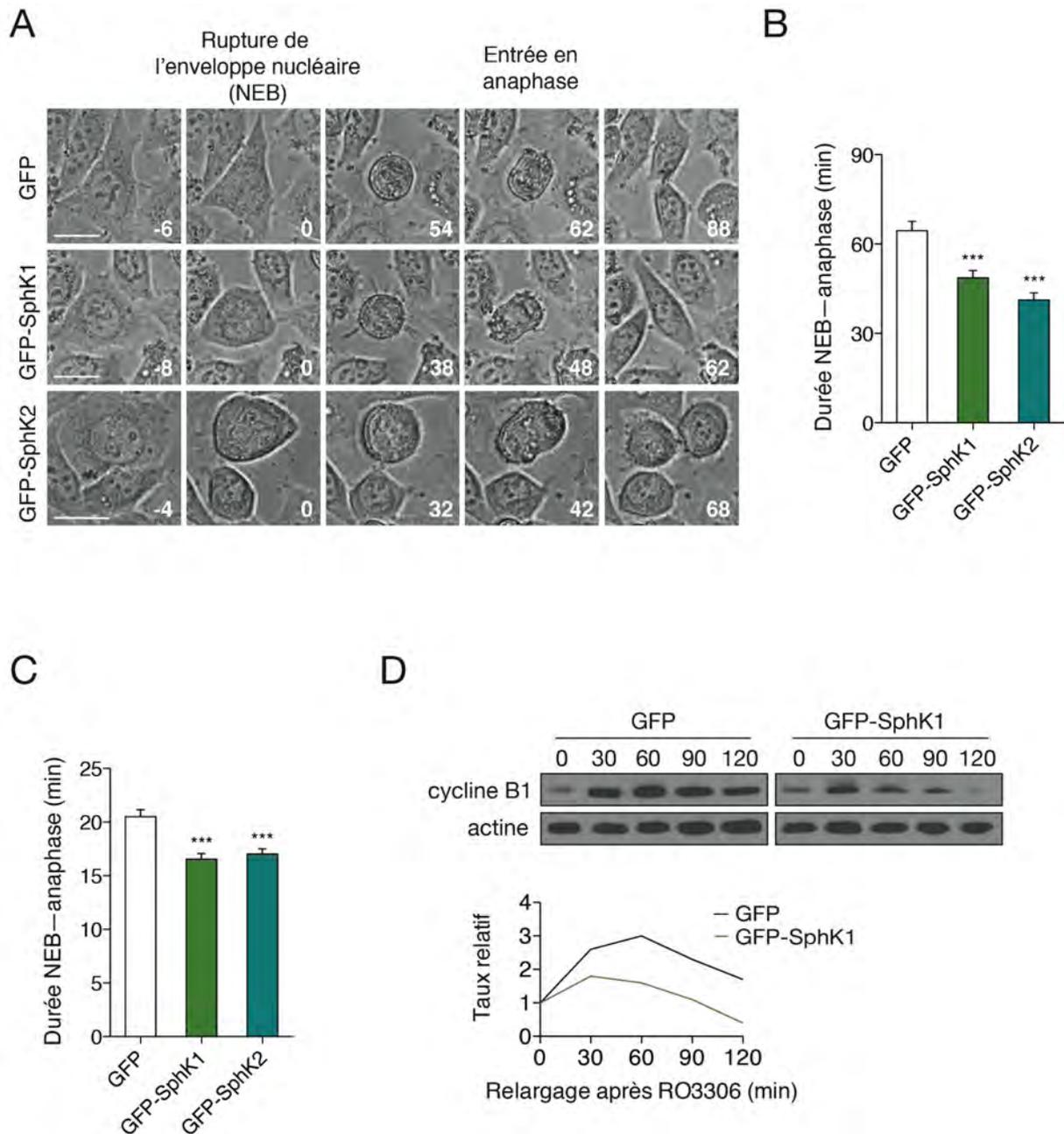


Figure 22. La surexpression des SphKs raccourcit la durée de la prométaphase.

(A) Images issues de vidéomicroscopie prises toutes les deux minutes représentant le déroulement de la mitose de cellules HeLa asynchrones surexprimant la GFP seule ou les GFP-SphKs 48h après transfection par les différents plasmides (lumière transmise). Les temps indiqués représentent la durée depuis le NEB (min). Barre d'échelle : 10 μ m.

(B) Analyse quantitative de la durée NEB—anaphase dans des cellules HeLa asynchrones. Les cellules ont été transfectées par les différents plasmides pendant 48h avant les expériences de vidéomicroscopie. Seules les cellules positives pour la GFP ont été analysées. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de deux expériences indépendantes (GFP, n = 152 cellules analysées ; GFP-SphK1, n = 180 ; GFP-SphK2, n = 170). ***, $p < 0,001$ (ANOVA).

(C) La surexpression des GFP-SphKs réduit significativement la durée NEB—anaphase dans des cellules RPE1 asynchrones. Les cellules ont été transfectées pendant 48h avant les expériences de vidéomicroscopie. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes (GFP, n = 139 ; GFP-SphK1, n = 138 ; GFP-SphK2, n = 128). ***, $p < 0,001$ (ANOVA).

(D) Mesure de l'expression de la cycline B1 par Western blot. Les cellules HeLa surexprimant la GFP ou la GFP-SphK1 depuis 48h ont été synchronisées à la transition G2/M par le RO3306 puis relarguées en mitose pendant les temps indiqués (min). Le graphe représente les ratios cycline B1/actine normalisés par rapport au temps 0. Le résultat d'une expérience représentative parmi trois indépendantes est représenté.

Nos résultats montrent donc que la surexpression des SphKs induit un raccourcissement de la durée de la prométaphase qui s'accompagne d'une diminution plus rapide de l'expression de la cycline B1. Le mutant G82D de la SphK1 est décrit comme non activable (Pitson et al., 2000b). En effet, sa surexpression n'induit pas d'augmentation de l'activité kinase de la SphK1 dans des cellules HeLa (Figures 23A et B) De façon intéressante, la surexpression du mutant SphK1^{G82D} ne module pas la durée de la prométaphase dans la lignée HeLa, suggérant que l'activité catalytique des SphKs est importante pour cette régulation (Figure 23C).

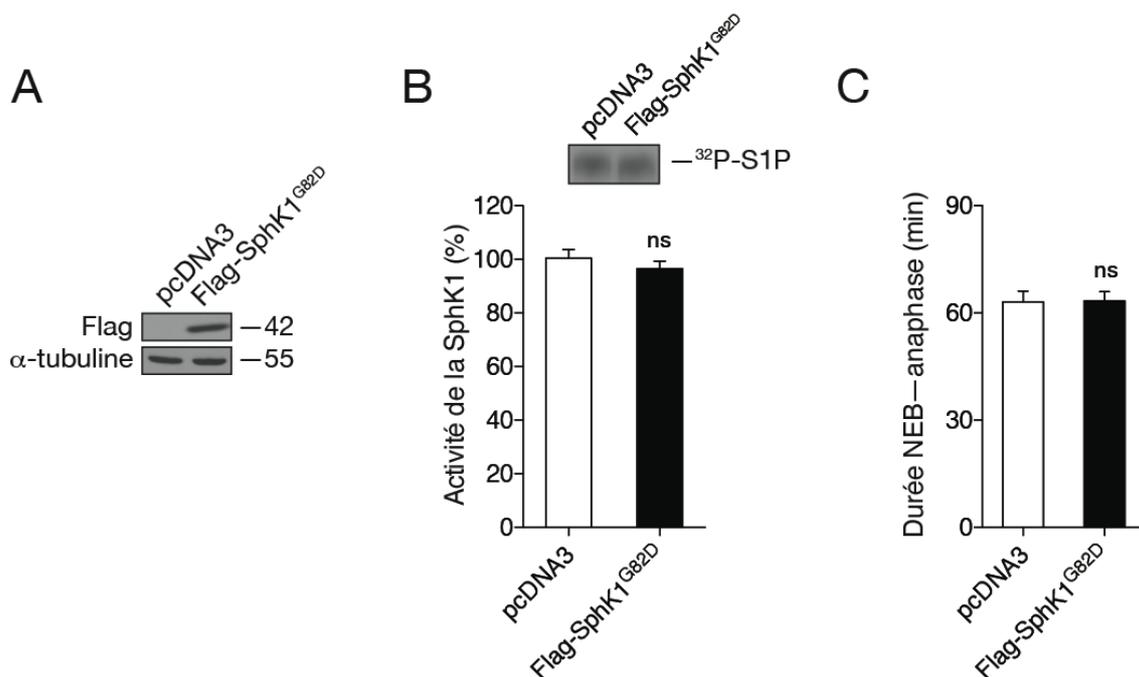


Figure 23. Le mutant catalytiquement inactif de la SphK1 ne module pas la durée de la prométaphase.

(A) Validation de la surexpression du mutant Flag-SphK1^{G82D} par Western blot dans les cellules HeLa. Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.

(B) Mesure de l'activité kinase de la SphK1 dans des cellules HeLa contrôles (pcDNA3) ou surexprimant le mutant Flag-SphK1^{G82D}. Les cellules ont été transfectées pendant 48h par les différents plasmides avant la mesure de l'activité kinase de la SphK1. Les films d'autoradiographie représentant la quantité de S1P radiomarquée formée au cours du test d'activité kinase sont

également montrés. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de deux expériences indépendantes. ns (non significatif), $p > 0,05$ (test de Student).

(C) Quantification de la durée NEB—anaphase dans des cellules HeLa asynchrones contrôles (pcDNA3) ou surexprimant le mutant Flag-SphK1^{G82D}. Les cellules ont été transfectées pendant 48h avec les différents plasmides avant les expériences de vidéomicroscopie. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de deux expériences indépendantes (pcDNA3, $n = 100$; Flag-SphK1^{G82D}, $n = 100$). ns (non significatif), $p > 0,05$ (test de Student).

3. La déplétion des SphKs prolonge la durée de la prométaphase

Nous avons ensuite évalué l'effet de la déplétion des SphKs sur le déroulement de la mitose. L'efficacité et la spécificité des siRNAs ont été vérifiées dans les lignées HeLa et RPE1 par Western blot après 48h de déplétion (Figures 24A et 25A respectivement). Chaque siRNA induit une déplétion *a minima* de près de 80% de la protéine correspondance. De plus, aucune réaction croisée n'est observée : le siRNA dirigé contre l'ARNm de la SphK1 (siSphK1) ne déplete que la SphK1 et n'affecte pas la SphK2, et de façon inverse, le siSphK2 ne module pas l'expression de la SphK1 (Figures 24A et 25A).

Nous avons déterminé l'effet de ces déplétions sur l'index mitotique de populations de cellules HeLa ou RPE1 asynchrones. Dans ces deux lignées, la déplétion de la SphK1 ou de la SphK2 induit une augmentation du pourcentage de cellules en mitose (Figures 24B et 25B). Ceci peut notamment être dû à un arrêt de la progression en mitose. Pour vérifier cela, nous avons déterminé comme précédemment la durée entre le NEB et l'entrée en anaphase lors de la mitose de populations cellulaires HeLa asynchrones non transfectées (NT), transfectées avec un siRNA contrôle (scramble) ou déplétées pour la SphK1 ou la SphK2 (Figure 24C). Les durées moyennes entre NEB et anaphase des cellules non transfectées et contrôles sont similaires ($60,2 \pm 1,9$ min et $61,4 \pm 5,1$ min respectivement). En revanche, pour les cellules déplétées pour la SphK1 ou la SphK2, cette durée est significativement augmentée de plus de 80% ($108,5 \pm 8$ min et $109,9 \pm 8,7$ min respectivement). De façon intéressante, la déplétion des deux SphKs rallonge également la durée NEB—anaphase ($104,7 \pm 3$ min) mais n'entraîne pas d'effet additif. Ces résultats ont été reproduits dans la lignée RPE1 (Figure 25C).

Nous avons également mesuré les taux d'expression de la cycline B1 en mitose dans des cellules HeLa transfectées par un siRNA contrôle (scramble) ou déplétées pour la SphK1. Comme précédemment, les cellules ont été synchronisées à la transition G2/M à l'aide du RO3306 puis relarguées en mitose et récupérées à différents temps de relargage. Dans les cellules contrôles, la cycline B1 s'accumule et son expression décroît à partir de 60 min de relargage, ce qui correspond au temps moyen d'entrée en anaphase de ces cellules (Figures 24C et D). En revanche, l'expression de la cycline B1 ne décline qu'à partir de 90 min dans les cellules déplétées pour la SphK1, ce qui concorde avec le timing de leur entrée en anaphase (Figures 24C et D).

Ces données indiquent donc que la déplétion des SphKs induit un allongement de la durée de la prométaphase.

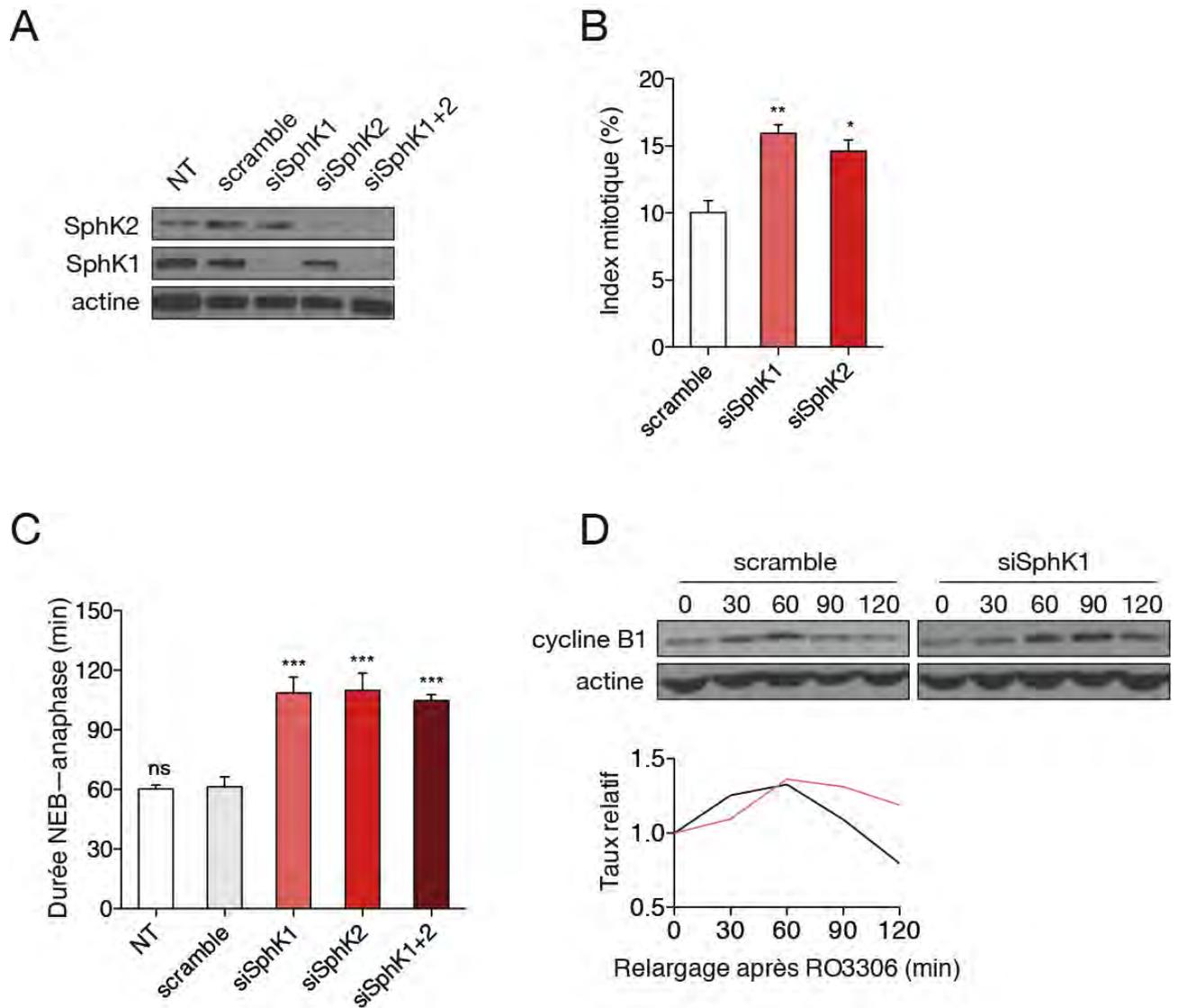


Figure 24. La déplétion des SphKs prolonge la durée de la prométaphase dans des cellules HeLa.

(A) Validation de la déplétion par siRNA des SphKs. Les cellules ont été transfectées pendant 48h avec les différents siRNAs scramble (contrôle), dirigé contre l'ARNm de la SphK1 (siSphK1) ou de la SphK2 (SphK2), ou siSphK1+siSphK2 (concentration finale : 50 nM) et l'expression des SphKs a été mesurée par Western blot. Le résultat présenté ici est représentatif de trois expériences indépendantes.

(B) Mesure de l'index mitotique dans des cellules HeLa asynchrones déplétées ou non pour les SphKs. Les cellules ont été transfectées pendant 48h avec les différents siRNAs avant l'évaluation de l'index mitotique comme décrit précédemment. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes (scramble, $n = 1987$; siSphK1, $n = 2107$; siSphK2, $n = 2123$). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ (ANOVA).

(C) Quantification de la durée de la prométaphase dans des cellules HeLa asynchrones déplétées ou non pour les SphKs. Les cellules ont été transfectées pendant 48h avec les différents siRNAs avant les expériences de vidéomicroscopie. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes (non transfectées (NT), $n = 100$; scramble, $n = 111$; siSphK1, $n = 78$; siSphK2, $n = 94$; siSphK1+2, $n = 100$). ns (non significatif), $p > 0,05$; ***, $p < 0,001$ (ANOVA).

(D) Mesure de l'expression de la cycline B1 par Western blot dans des cellules HeLa déplétées ou non pour la SphK1. Les cellules transfectées pendant 48h avec les différents siRNAs ont été synchronisées à la transition G2/M par le RO3306 puis relarguées en mitose pendant les temps indiqués (min). Le graphe représente les ratios cycline B1/actine normalisés par rapport au temps 0. Le résultat d'une expérience représentative parmi trois indépendantes est représenté.

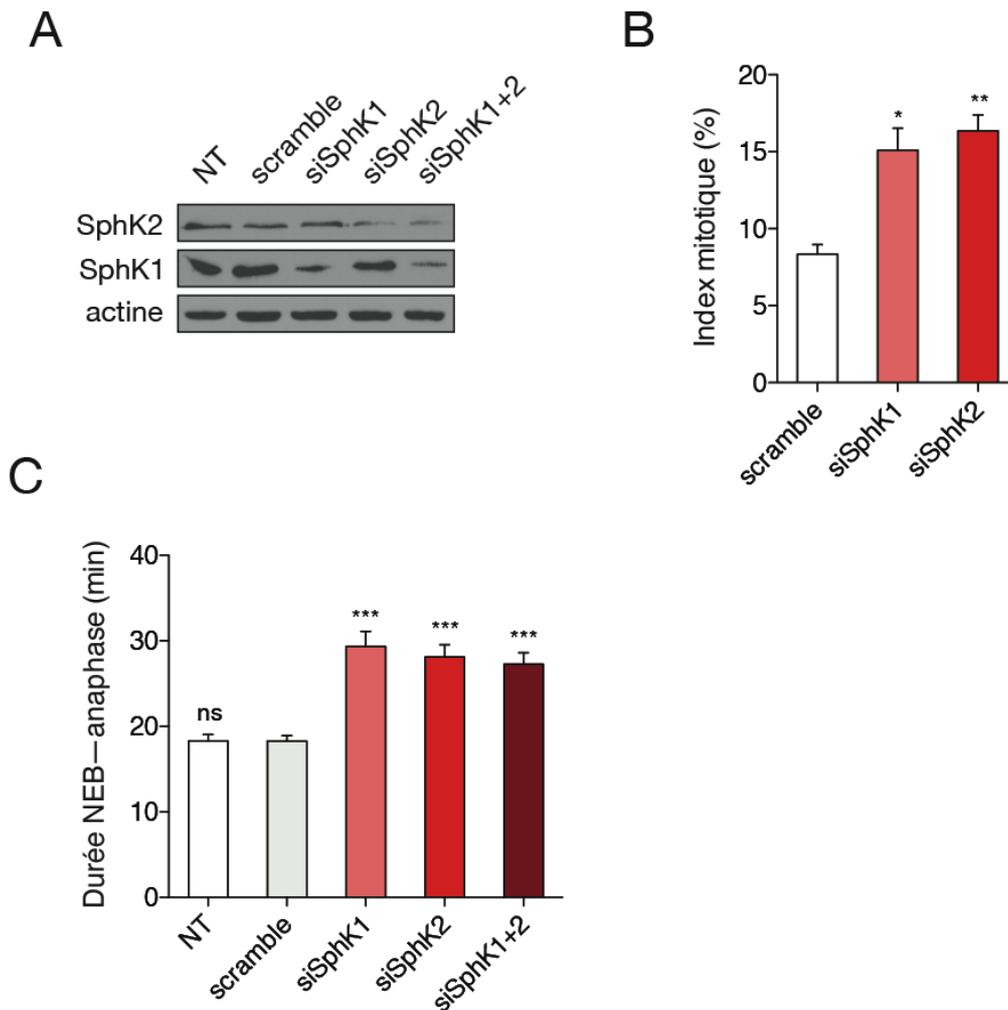


Figure 25. La déplétion des SphKs prolonge la durée de la prométaphase dans des cellules RPE1.

(A) Validation de la déplétion par siRNA des SphKs. Les cellules RPE1 ont été transfectées pendant 48h avec les différents siRNAs (concentration finale : 20 nM) et l'expression des SphKs a été mesurée par Western blot. Le résultat présenté ici est représentatif de deux expériences indépendantes.

(B) Mesure de l'index mitotique dans des cellules RPE1 asynchrones déplétées ou non pour les SphKs. Les cellules ont été transfectées pendant 48h avec les différents siRNAs avant l'évaluation de l'index mitotique comme décrit précédemment. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de deux expériences indépendantes (scramble, n = 1718 ; siSphK1, n = 1803 ; siSphK2, n = 1827). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ (ANOVA).

(C) Quantification de la durée de la prométaphase dans des cellules RPE1 asynchrones déplétées ou non pour les SphKs. Les cellules ont été transfectées pendant 48h avec les différents siRNAs avant les expériences de vidéomicroscopie. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de deux expériences indépendantes (non transfectées (NT), n = 78 ; scramble, n = 110 ; siSphK1, n = 61 ; siSphK2, n = 100 ; siSphK1+2, n = 66). ns (non significatif), $p > 0,05$; ***, $p < 0,001$ (ANOVA).

4. L'inhibition pharmacologique de la SphK1 prolonge la durée de la prométaphase

Nous avons ensuite testé si l'inhibition de la SphK1 reproduit l'effet de la déplétion des SphKs. Nous avons utilisé deux inhibiteurs compétitifs du site de la liaison de la sphingosine sur la SphK1 : le

SKi (à 10 μ M) (French et al., 2003) et le PF543 (à 100 nM) (Schnute et al., 2012). Ces deux composés induisent une inhibition de plus de 70-90% de l'activité enzymatique de la SphK1 selon l'inhibiteur dès 6h de traitement dans des cellules HeLa et RPE1 (Figures 26A et D respectivement). Cette inhibition est similaire lors de traitements plus longs allant jusqu'à 24h (données non montrées). Le traitement d'une population asynchrone de HeLa par le SKi pendant 24h augmente significativement de 30% de l'index mitotique par rapport à la condition contrôle ($13,7 \pm 0,5$ % *versus* $10,5 \pm 0,5$ %) (Figures 26B). Des résultats similaires sont observés dans la lignée RPE1 où l'inhibition de la SphK1 par le SKi induit une augmentation de l'index mitotique de plus de 45% ($13,6 \pm 1,1$ % *versus* $9,4 \pm 0,5$ %) (Figure 26E).

Nous avons réalisé des expériences de vidéomicroscopie pour déterminer si l'inhibition de la SphK1 module la durée de la mitose. Pour cela, des cellules asynchrones HeLa ou RPE1 ont été traitées pendant les 12h de l'expérience par un solvant contrôle (DMSO) ou par les inhibiteurs de la SphK1. Le traitement par le SKi ou le PF543 augmentent de façon significative la durée NEB— anaphase par rapport au contrôle dans la lignée HeLa ($101,8 \pm 8,6$ min et $88,2 \pm 4,9$ min respectivement *versus* $62,4 \pm 3,4$) (Figure 26C) ainsi que chez les RPE1 ($22,3 \pm 0,7$ min pour le SKi et $39,6 \pm 3,1$ min pour le DMSO) (Figure 26F). Ainsi, tout comme la déplétion des SphKs, l'inhibition de la SphK1 rallongent la durée de la prométaphase.

Nos résultats démontrent ainsi que l'expression et l'activité catalytique des SphKs sont importantes pour la régulation de la progression mitotique.

5. Les SphKs régulent la progression mitotique par l'intermédiaire de la production de S1P

Les SphKs produisent de la S1P, un lipide bioactif impliqué dans la régulation de nombreux effets biologiques. L'activité SphK régulant la progression mitotique (Figure 26), nous avons donc évalué l'effet d'une stimulation des cellules par de la S1P exogène sur la mitose. Dans un premier temps, nous avons déterminé les doses de S1P suffisantes pour induire ses effets biologiques. Il est notamment décrit que la S1P stimule la phosphorylation de Erk1/2. Nous avons donc utilisé ce critère pour caractériser l'efficacité des doses de S1P exogène dans nos cellules. Pour cela, nous avons cultivé des cellules HeLa dans un milieu sans sérum pendant 3h pour les priver de tout stimulus activateur de la voie des MAPK. Nous avons ensuite effectué une cinétique de stimulation par différentes doses de S1P et mesuré en réponse le taux de phosphorylation de Erk1/2. De toutes les doses testées, nous avons mesuré un effet optimal de la S1P à 5 μ M dès 30 min de traitement (Figure 27A). Un traitement similaire a la même efficacité dans la lignée RPE1 (données non montrées).

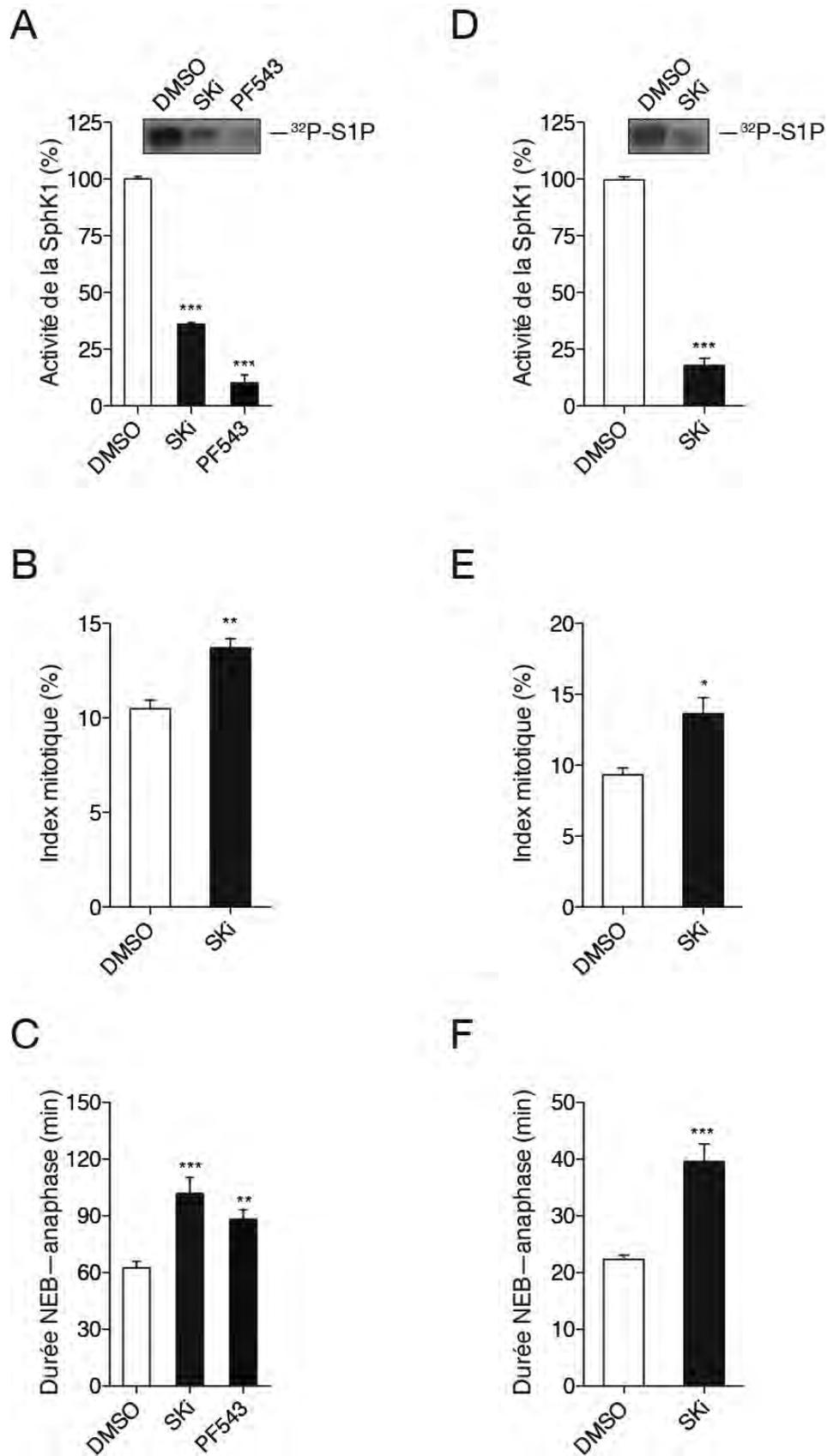


Figure 26. L'inhibition de la SphK1 prolonge la durée de la prométaphase.
 (A) et (D) Validation de l'efficacité des inhibiteurs de la SphK1 dans les cellules HeLa (A) et RPE1 (D).
 Les cellules ont été traitées par le SKI (10 µM) ou le PF543 (100 nM) pendant 6h avant la mesure de

l'activité kinase de la SphK1. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes. Les films d'autoradiographie représentant la quantité de S1P radiomarquée formée au cours du test d'activité kinase sont également montrés. ***, $p < 0,001$ (test de Student ou ANOVA). (B) et (E) Mesure de l'index mitotique dans des cellules HeLa (B) ou RPE1 (E) asynchrones inhibées ou non pour la SphK1. Les cellules ont été traitées par le SKi (10 μ M) pendant 24h puis l'index mitotique a été calculé comme décrit précédemment. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes (B : DMSO, n = 2306 ; SKi, n = 2567 — D : DMSO, n = 1245 ; SKi, n = 1184). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ (test de Student). (C) et (F) Quantification de la durée de la prométaphase dans des cellules HeLa (C) et RPE1 (F) asynchrones inhibées ou non pour la SphK1. Les cellules ont été traitées par le SKi (10 μ M) pendant la totalité de la durée des expériences de vidéomicroscopie soit 12h. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes (C : DMSO, n = 100 ; SKi, n = 122 ; PF543, n = 100 — F : DMSO, n = 115 ; SKi, n = 74). **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ (ANOVA).

Nous avons ensuite déterminé l'effet de la stimulation par de la S1P exogène sur la mitose. Premièrement, dans une population cellulaire HeLa asynchrone, une stimulation de 24h induit une diminution significative de près de 50% de l'index mitotique par rapport au contrôle ($6,1 \pm 0,4$ % *versus* $10,5 \pm 0,4$ %) (Figure 27B). Nous avons également déterminé le pourcentage de cellules arrêtées en prométaphase en présence de nocodazole. Nous avons donc traité des cellules HeLa par le nocodazole en présence ou non de S1P pendant 16h et avons analysé l'index mitotique de ces populations. Alors qu'une majorité des cellules contrôles (DMSO) sont en mitose après le traitement par le nocodazole ($56,3 \pm 4,3$ %), cette proportion est significativement réduite de 25 % par la S1P ($42,6 \pm 2,1$ %) (Figure 27C).

La S1P diminue également de façon significative l'index mitotique d'une population asynchrone de cellules RPE1 ($4,7 \pm 0,6$ % pour la S1P contre $9,3 \pm 0,5$ % pour le contrôle) (Figure 27D). De plus, la stimulation d'une population cellulaire asynchrone par la S1P durant la totalité des expériences de vidéomicroscopie induit un raccourcissement de la durée de la prométaphase, et ce dans un large spectre de lignées cellulaires humaines qu'elles soient transformées (HeLa, PC-3, CAKI-1), immortalisées (RPE1) ou primaires (HUVEC) (Figure 27E). Ces données indiquent que l'effet de la S1P ne dépend pas de la lignée cellulaire utilisée ni de leur état cancéreux, mais semble plutôt être un mécanisme conservé.

Nous avons également analysé l'expression de la cycline B1 dans des cellules HeLa synchronisées en G2/M puis relarguées en présence ou non de S1P exogène. Alors que la cycline B1 s'accumule pendant 60 min et est dégradée au-delà, la stimulation par la S1P induit une dégradation anticipée de la cycline B1 dès 30 min de relargage selon un timing en relation avec la durée de la prométaphase mesurée dans ces conditions (Figures 27E et F).

Nous avons ensuite utilisé un outil innovant pour préciser l'implication de la S1P dans le contrôle de la mitose. Depuis 2006, un anticorps neutralisant la S1P, le Sphingomab™, a été développé (Visentin et al., 2006). Ainsi, dans nos conditions, l'ajout de cet anticorps dans le milieu de culture

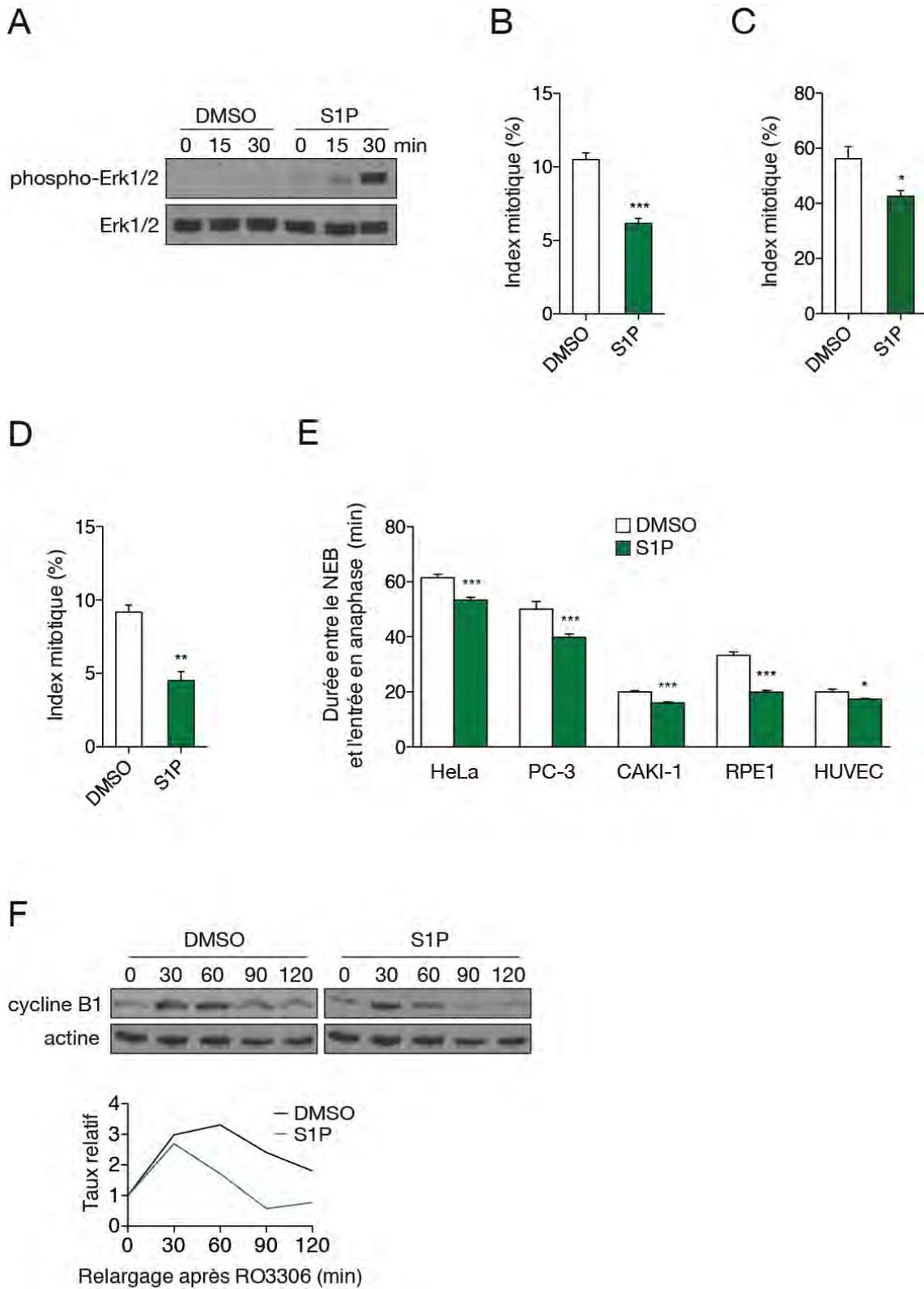


Figure 27. Le traitement par la S1P raccourcit la durée de la prométaphase.

(A) Validation de l'efficacité de la S1P. Les cellules HeLa ont été cultivées dans un milieu sans sérum pendant 3h puis stimulé par 5 μ M de S1P pendant les temps indiqués (min). La phosphorylation de Erk1/2, une cible de la S1P, a été évaluée par Western blot. Le résultat présenté est représentatif de trois expériences indépendantes.

(B) Mesure de l'index mitotique dans une population cellulaire HeLa asynchrone en réponse à la S1P. Les cellules ont été traitées pendant 24h par 5 μ M de S1P et l'index mitotique a été évalué comme décrit précédemment. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de quatre expériences indépendantes (DMSO, n = 2306 ; S1P, n = 2337). **, $p < 0,01$ (test de Student).

(C) Mesure de l'index mitotique dans des cellules HeLa traitées au nocodazole. Les cellules ont été traitées pendant 16h au nocodazole (0,2 μ g/ml) en présence ou non S1P (5 μ M) avant l'évaluation de l'index mitotique. Les histogrammes représentent les moyennes \pm SEM de deux expériences indépendantes (DMSO, n = 1224 ; S1P, n = 1023). *, $p < 0,05$ (ANOVA).

(D) Mesure de l'index mitotique dans une population cellulaire RPE1 asynchrone. Les cellules ont été traitées pendant 24h par 5 μ M de S1P et l'index mitotique a été évalué comme décrit précédemment. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes (DMSO, n = 1245 ; S1P, n = 1177). **, $p < 0,01$ (test de Student).

(E) Mesure de la durée de la prométaphase dans de nombreuses lignées cellulaires transformées (HeLa, PC-3, CAKI-1), immortalisées (RPE1) ou primaires (HUVEC) en réponse à la S1P. Les cellules ont été traitées par 5 μ M de S1P pendant la totalité de la durée des expériences de vidéomicroscopie soit 12h. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes (n > 150). *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$ (test de Student).

(F) Mesure de l'expression de la cycline B1 par Western blot. Les cellules HeLa ont été synchronisées à la transition G2/M par le RO3306 puis relarguées en mitose en présence ou non de S1P (5 μ M) pendant les temps indiqués (min). Le graphe représente les ratios cycline B1/actine normalisés par rapport au temps 0. Le résultat d'une expérience représentative parmi trois indépendantes est représenté.

bloque la signalisation de la S1P (Figure 28A). De façon intéressante, la neutralisation par le Sphingomab™ de la S1P endogène sécrétée par des cellules HeLa dans le milieu de culture durant la totalité des expériences de vidéomicroscopie induit une augmentation significative de 35% de la durée entre le NEB et l'entrée en anaphase en comparaison avec le traitement par un anticorps contrôle de même isotype ($86,9 \pm 3$ % *versus* $64,2 \pm 1,7$ %) (Figure 28B). Des résultats similaires ont été obtenus dans la lignée RPE1 ($40,3 \pm 2,3$ % *versus* $22,6 \pm 0,6$ %) (Figure 28C).

Ces données démontrent donc que les SphKs régulent la progression mitotique par l'intermédiaire de la production de S1P dans un large spectre de lignées cellulaires. De plus, alors que la S1P peut agir de façon intra- ou extracellulaire, nos résultats suggèrent que ce sphingolipide régule la durée de la mitose en agissant de façon extracellulaire. La neutralisation de la S1P extracellulaire produite par les cellules dans le milieu par un anticorps bloquant prolonge la durée de la prométaphase de façon similaire à la déplétion des SphKs ou à leur inhibition.

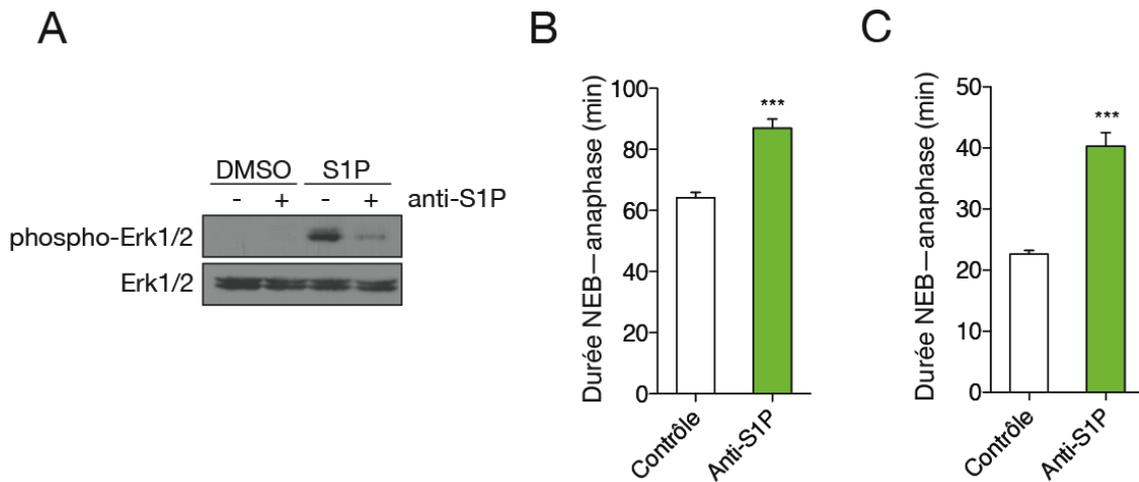


Figure 28. La neutralisation de la S1P extracellulaire prolonge la durée de la prométaphase.

(A) Validation de la neutralisation de la S1P. Les cellules HeLa ont été cultivées dans un milieu sans sérum pendant 3h puis stimulé ou non par 5 μ M de S1P en présence de 50 μ g/ml d'anticorps contrôle (-) ou d'anticorps anti-S1P (+) pendant 30 min. La phosphorylation de Erk1/2 a été évaluée par Western blot. Le résultat présenté est représentatif de trois expériences indépendantes.

(B) Mesure de la durée de la prométaphase dans des cellules HeLa asynchrones après neutralisation de la S1P extracellulaire produite par les cellules. Les cellules ont été incubées avec 50 μ g/ml d'anticorps contrôle ou anti-S1P pendant la totalité de la durée des expériences de vidéomicroscopie soit 12h. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes (Contrôle, n = 128 ; Anti-S1P, n = 129). ***, $p < 0,001$ (test de Student).

(C) Mesure de la durée de la prométaphase dans des cellules RPE1 asynchrones après neutralisation de la S1P extracellulaire. Les cellules ont été incubées avec 50 μ g/ml d'anticorps contrôle ou anti-S1P pendant la totalité de la durée des expériences de vidéomicroscopie soit 12h. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de deux expériences indépendantes (Contrôle, n = 172 ; Anti-S1P, n = 172). ***, $p < 0,001$ (test de Student).

6. La S1P requiert le récepteur S1P₅ pour contrôler la progression mitotique

L'action extracellulaire de la S1P passe par son interaction avec cinq récepteurs spécifiques couplés aux protéines G, les S1PRs (S1P₁₋₅). Ses différentes réponses biologiques dépendent notamment du niveau d'expression de ces récepteurs. Nous avons donc déterminé leur profil d'expression dans les lignées HeLa et RPE1 en mesurant les taux de l'ARNm par qRT-PCR (Figure 29A) et de la protéine par Western blot (Figure 29B) de chaque S1PR. Nos analyses révèlent que chaque lignée exprime tous les S1PR.

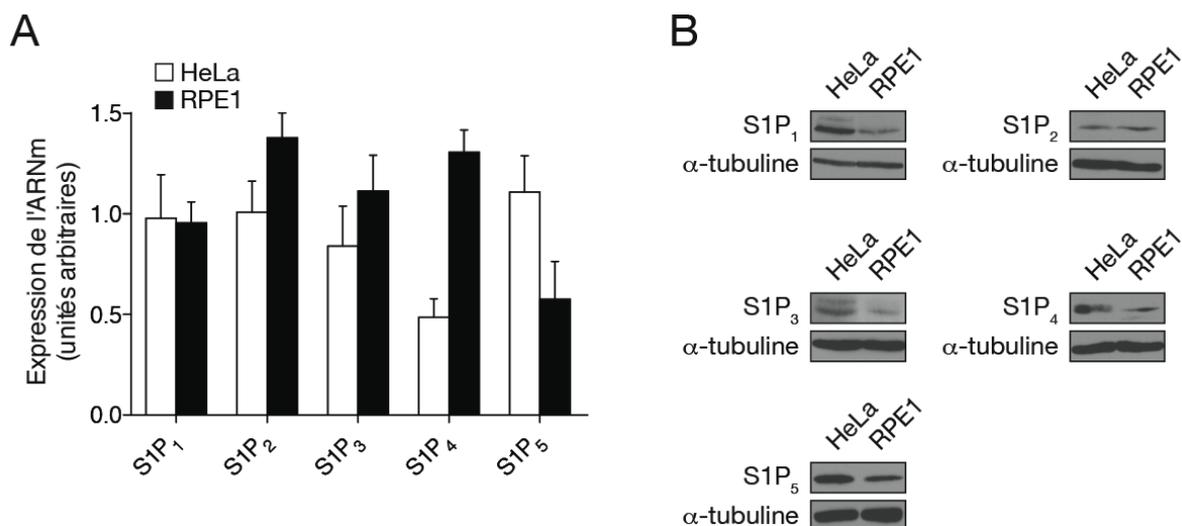


Figure 29. Détermination du profil d'expression des S1PRs par les lignées HeLa et RPE1

(A) Profil d'expression de l'ARNm des S1PRs par qRT-PCR. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de neuf expériences indépendantes. Les résultats exprimés correspondent au calcul des $2^{-\Delta Ct}$ pour chaque gène.

(B) Profil d'expression des S1PRs par Western blot. Les résultats présentés sont représentatifs de six expériences indépendantes.

En combinant l'utilisation d'antagonistes de ces récepteurs et une stratégie de déplétion par interférence ARN, nous avons cherché à caractériser les S1PRs impliqués dans la régulation de la progression mitotique par la voie SphKs/S1P. Le traitement par le VPC23019, un antagoniste des récepteurs S1P₁ et S1P₃ (Davis et al., 2005b), est capable de bloquer leur signalisation induite par la S1P dans la lignée HeLa (Figure 30A). Néanmoins, le traitement d'une population cellulaire HeLa asynchrone par le VPC23019 n'induit pas de modulation de la durée de la prométaphase (Figure 30B). De façon similaire, l'antagonisme du S1P₂ par le JTE013 ne modifie pas la durée NEB—anaphase dans les cellules HeLa (Figure 30B). Des résultats analogues ont été obtenus pour la lignée RPE1 (données non montrées).

Mis à part des composés antagonistes, peu d'outils sont décrits à ce jour pour l'étude des S1PRs. Nous avons donc établi une stratégie d'interférence ARN dirigée contre le S1P₂, le S1P₄ et le S1P₅ dont nous avons préalablement validé l'efficacité dans les cellules HeLa et RPE1 (Figure 30C et données non montrées). La déplétion du S1P₂ n'induit pas de modulation de la durée de la prométaphase dans la lignée HeLa, confirmant les résultats obtenus à l'aide de l'antagoniste JTE013 (Figures 30B et D). De même, la déplétion du S1P₄ n'a aucun effet sur la durée NEB—anaphase dans les cellules HeLa (Figure 30D). Enfin, seule la déplétion du S1P₅ induit une augmentation significative de près de 45% de cette durée par rapport à la condition scramble contrôle ($83,3 \pm 4,3$ min *versus* $58,2 \pm 1,1$ min) chez les cellules HeLa (Figure 30D). Des résultats similaires ont été obtenus pour la lignée RPE1 (données non montrées). Nos résultats suggèrent donc que seul le récepteur S1P₅ est impliqué dans la régulation de la progression mitotique par la S1P.

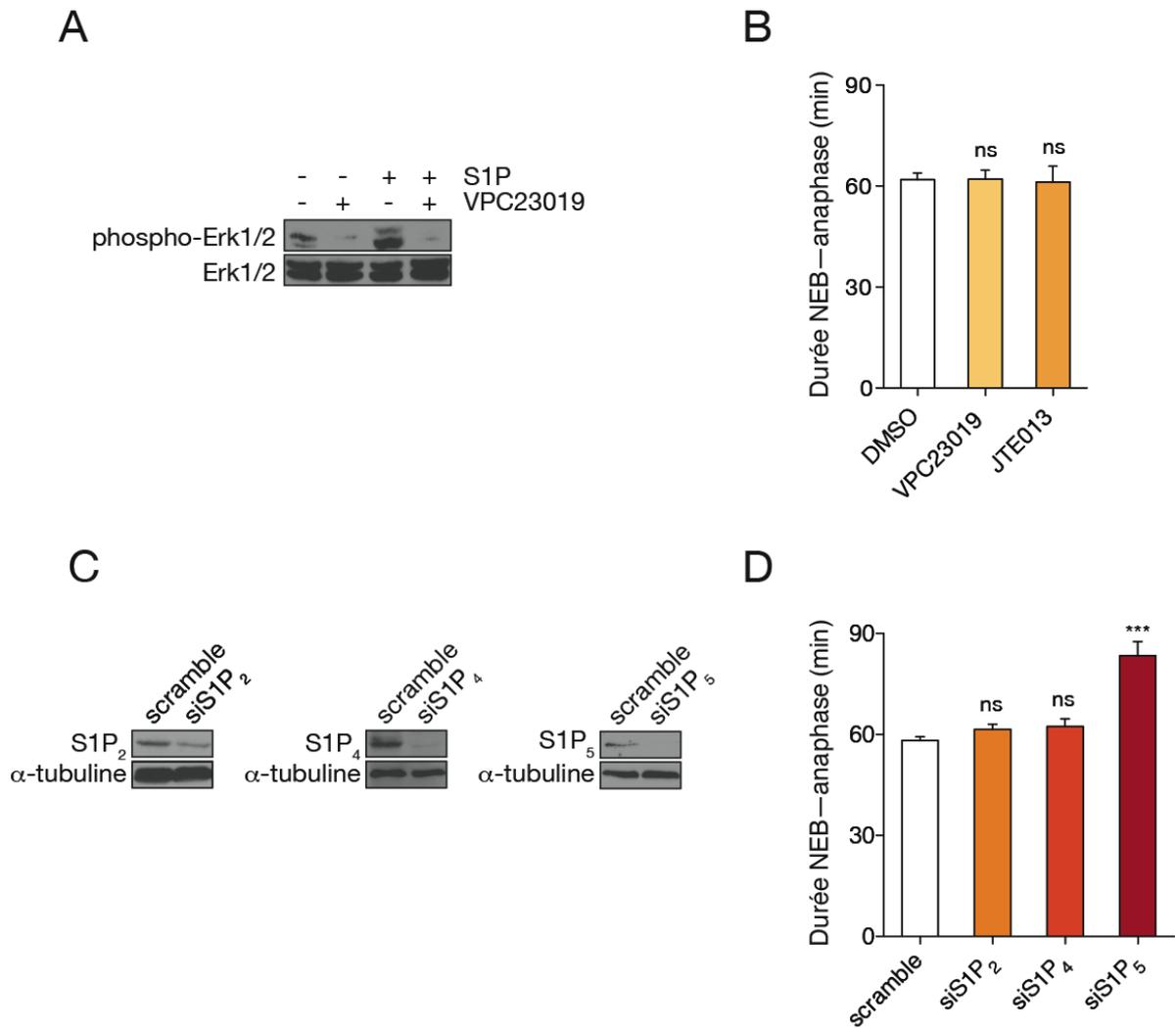


Figure 30. La déplétion du S1P₅ rallonge la durée de la prométaphase.

(A) Validation de l'inhibition du S1P₁ et du S1P₃ par le VPC23019. Les cellules HeLa ont été cultivées dans un milieu sans sérum pendant 3h puis stimulé par 5 μ M de S1P en présence ou non de VPC23019 à 5 μ M pendant 30 min. La phosphorylation de Erk1/2 a été évaluée par Western blot.

(B) Mesure de la durée de la prométaphase en présence d'antagonistes des S1PRs. Les cellules HeLa ont été traitées par les différents antagonistes des S1PRs à 5 μ M pendant la totalité de la durée des expériences de vidéomicroscopie soit 12h. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes ($n > 150$). ns, $p > 0,05$ (ANOVA).

(C) Validation de la déplétion des S1PRs par siRNA. Les cellules HeLa ont été transfectées pendant 48h avec les différents siRNAs (concentration finale : 50 nM) et l'expression des SphKs a été mesurée par Western blot. Le résultat présenté ici est représentatif de trois expériences indépendantes.

(D) Mesure de la durée de la prométaphase suite à la déplétion des S1PRs. Les cellules HeLa ont été transfectées pendant 48h avec les différents siRNAs avant les expériences de vidéomicroscopie. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes ($n > 150$). ns, $p > 0,05$; ***, $p < 0,001$ (ANOVA).

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons stimulé des cellules HeLa asynchrones déplétées pour le S1P₂ ou le S1P₅ et calculé la durée de la prométaphase dans ces conditions. De façon similaire aux résultats précédemment obtenus, le traitement par la S1P induit une diminution significative de

près de 20% de la durée NEB—anaphase (Figures 31A et B *versus* Figure 27E). De plus, la déplétion du S1P₂ ne module pas cette durée alors que la S1P est capable de réduire la durée de la prométaphase dans des cellules déplétées pour le S1P₂ (Figure 31A). Ces données indiquent donc que ce récepteur n'est pas impliqué dans cette régulation. En revanche, l'effet de la S1P sur la durée de la prométaphase est aboli dans des cellules déplétées pour le S1P₅ (Figure 31B), indiquant son importance dans la régulation de la progression mitotique par la S1P.

Ces données démontrent pour la première fois que la voie SphKs/S1P/S1P₅ est un nouveau régulateur de la progression mitotique.

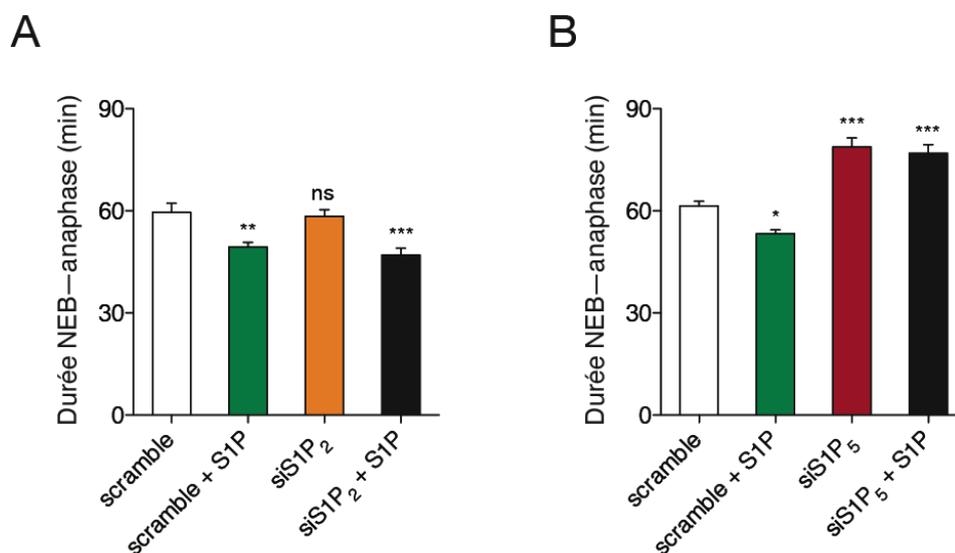


Figure 31. Le S1P₅ est impliqué dans la régulation de la durée de la mitose par la voie SphKs/S1P.
 (A) Mesure de la durée NEB—anaphase dans des cellules HeLa déplétées ou non pour le S1P₂ en présence ou non de S1P. Les cellules ont été transfectées pendant 48h avec les différents siRNAs avant les expériences de vidéomicroscopie réalisées en présence ou non de S1P (5 μM) pendant 12h. Les histogrammes représentent la moyenne ± SEM de deux expériences indépendantes (n>100). ns, $p>0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$ (ANOVA).
 (B) Mesure de la durée NEB—anaphase dans des cellules HeLa déplétées ou non pour le S1P₅ en présence ou non de S1P. Les cellules ont été transfectées pendant 48h avec les différents siRNAs avant les expériences de vidéomicroscopie réalisées en présence ou non de S1P (5 μM) pendant 12h. Les histogrammes représentent la moyenne ± SEM de deux expériences indépendantes (n>100). *, $p<0,05$; ***, $p<0,001$ (ANOVA).

7. Détermination des signalisations impliquées en aval de la voie SphKs/S1P/S1P₅

Le récepteur S1P₅ est couplé aux protéines G α de type G α_i et G $\alpha_{12/13}$ et régule les voies PLC/IP₃/Ca²⁺, PI3K/Akt, de la GTPase Rho, de l'adénylate cyclase et de Erk1/2 (Gonda et al., 1999; Im et al., 2001; Jaillard et al., 2005; Malek et al., 2001; Novgorodov et al., 2007) (Figure 18). A l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques de deux de ces voies, nous avons évalué leur implication en aval de l'axe SphKs/S1P/S1P₅.

Premièrement, nous nous sommes intéressés à la voie des MAPKs pour évaluer l'implication d'Erk1/2 en aval du S1P₅. Nous avons utilisé l'U0126, un inhibiteur de MEK (l'activateur d'Erk1/2), et étudié son impact sur la mitose en présence ou non de S1P. Le traitement par 1 μ M d'U0126 pendant 30 min suffit à inhiber la phosphorylation d'Erk1/2 (Figure 32A). Le traitement par la S1P de cellules incubées en présence d'U0126 ne permet pas de restaurer l'activité de Erk1/2 (Figure 32A).

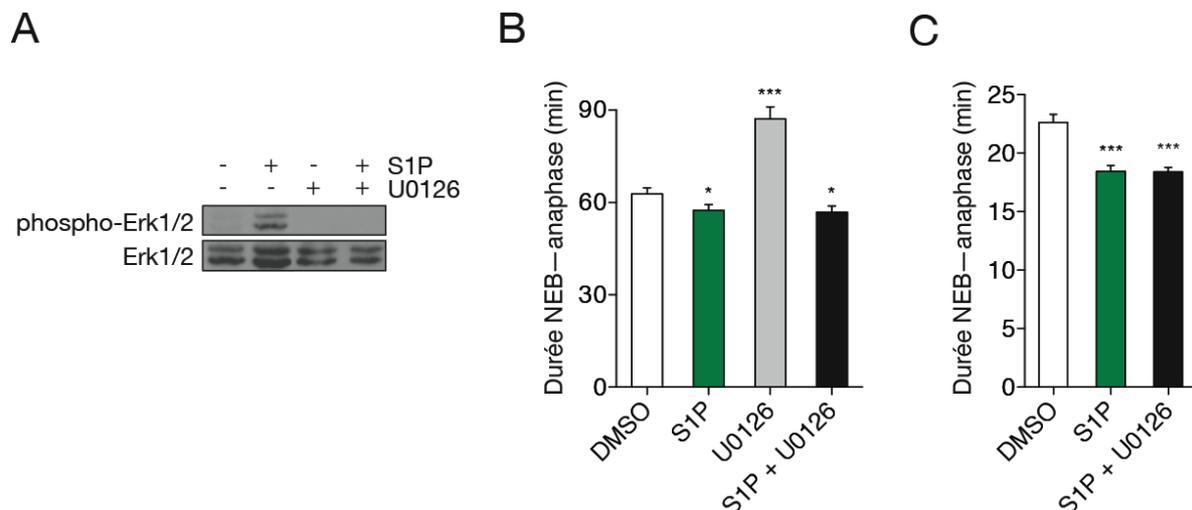


Figure 32. Rôle d'Erk1/2 en aval de l'axe SphKs/S1P/S1P₅.

(A) Validation de l'inhibition d'Erk1/2 par l'U0126. Les cellules HeLa ont été cultivées dans un milieu sans sérum pendant 3h puis stimulé par 5 μ M de S1P en présence ou non d'U0126 à 1 μ M pendant 30 min. La phosphorylation de Erk1/2 a été évaluée par Western blot.

(B) et (C) Mesure de la durée NEB—anaphase dans des cellules HeLa (B) et RPE1 (C) en présence ou non d'U0126 et de S1P. Les cellules ont été traitées ou non pendant 30 min à l'U0126 1 μ M puis les expériences de vidéomicroscopie ont été réalisées en présence ou non de S1P (5 μ M) et d'U0126 (1 μ M). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes (n>150). *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$ (ANOVA).

Nous avons réalisé des expériences de vidéomicroscopie dans des cellules asynchrones pour déterminer l'effet de cet inhibiteur seul ou en combinaison avec un traitement par de la S1P exogène sur la durée de la mitose. Le traitement par l'U0126 durant la totalité des expériences induit un allongement significatif de la durée NEB—anaphase dans des cellules HeLa par rapport à la

condition contrôle (Figure 32B). L'inhibition d'Erk1/2 induit donc l'effet opposé de la stimulation par la S1P. De plus, nous avons testé si l'effet de la S1P dépend de l'activité de la voie Erk1/2. En effet, si Erk1/2 est requis pour la régulation de la progression mitotique par la voie SphKs/S1P/S1P₅, nous nous attendons à ce que son inhibition abolisse l'effet de la S1P. Nous avons donc prétraité ou non des cellules HeLa asynchrones par l'U0126 pendant 30 min pour inhiber Erk1/2 puis réalisé des expériences de vidéomicroscopie en présence de S1P ± U016 pendant 12h et mesuré la durée NEB—anaphase. En condition d'inhibition de la voie Erk1/2 dans les cellules HeLa, la S1P induit toujours un raccourcissement significatif de la durée de la prométaphase (Figure 32B). Des résultats similaires ont été obtenus dans la lignée RPE1 (Figure 32C). L'ensemble de ces résultats indique donc que la voie MAPK ne semble pas être impliquée dans la régulation de mitose en aval de l'axe SphKs/S1P/S1P₅.

Nous nous sommes également intéressés à la voie des PI3Ks. Nous avons utilisé les inhibiteurs LY294002 et la wortmannine seuls ou avec la S1P pour déterminer l'implication des PI3Ks en aval de l'axe SphKs/S1P/S1P₅. Le traitement par les inhibiteurs seuls induit un allongement de la durée NEB—anaphase dans des cellules HeLa (Figures 33A et B) et RPE1 (Figure 33C). Nous avons ensuite inhibé ou non la voie PI3K pendant 1h avec la LY294002 ou la wortmannine puis réalisé des expériences de vidéomicroscopie en présence de S1P pendant 12h et mesuré la durée NEB—anaphase. Alors que la S1P induit un raccourcissement de la durée de la prométaphase, cet effet est aboli dans des cellules pré-traitées par des inhibiteurs de PI3K (Figures 33A—C). Nos données indiquent donc que l'axe SphKs/S1P/S1P₅ requiert l'activité de la voie des PI3Ks pour réguler la durée de la mitose.

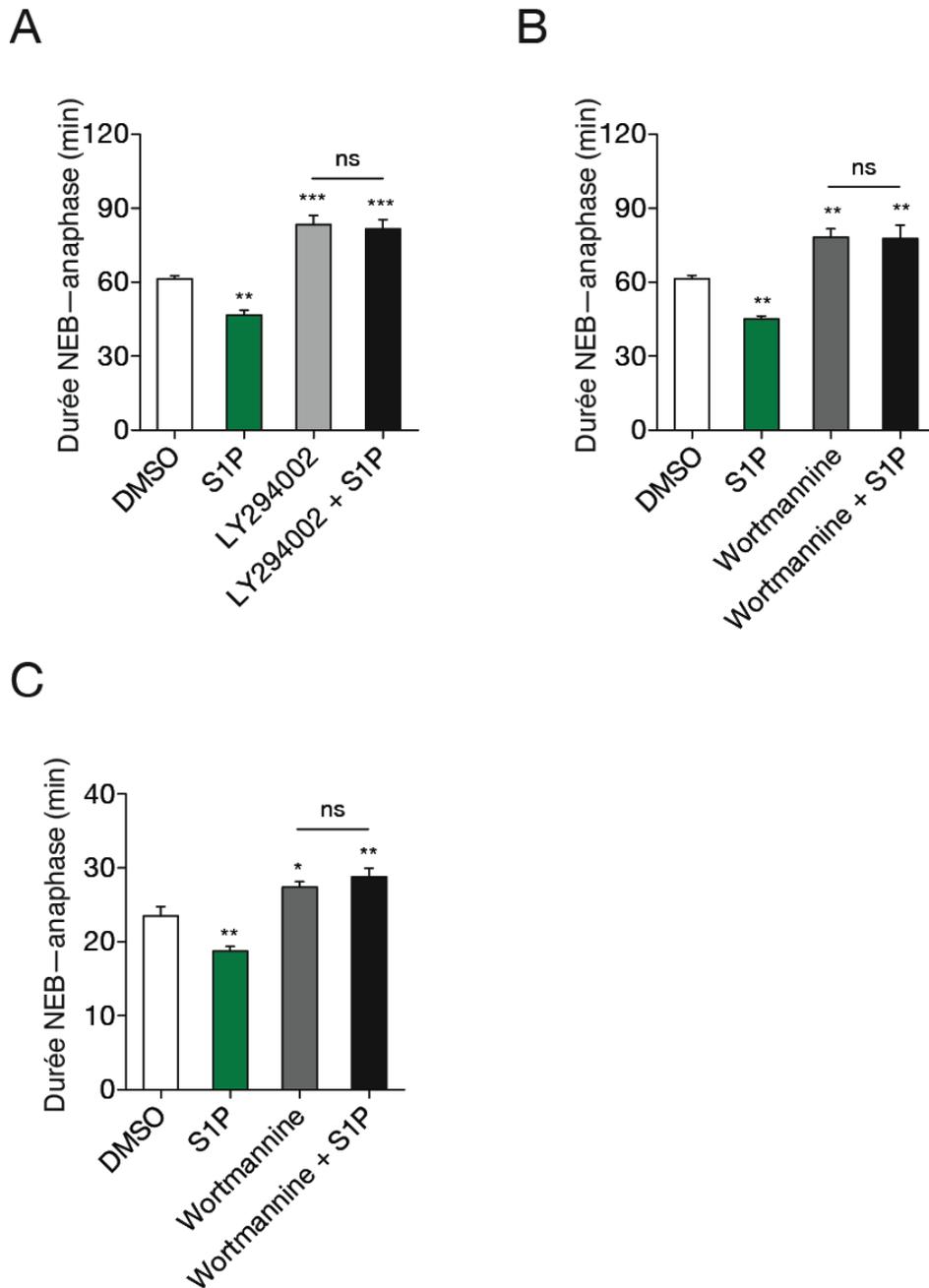


Figure 33. Implication de la voie PI3K/Akt en aval de l'axe SphKs/S1P/S1P₅.

(A) et (B) Mesure de la durée NEB—anaphase dans des cellules HeLa en présence ou non de S1P et de LY294002 (A) ou de wortmannine (B). Les cellules ont été traitées ou non pendant 30 min avec les inhibiteurs de PI3Ks (LY294002 10 μ M, wortmannine 1 μ M) puis les expériences de vidéomicroscopie ont été réalisées en présence ou non de S1P (5 μ M) et des inhibiteurs de PI3Ks (LY294002 10 μ M, wortmannine 1 μ M). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes ($n > 150$). ns, $p > 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ (ANOVA).

(C) Mesure de la durée NEB—anaphase dans des cellules RPE1 en présence ou non de S1P et de wortmannine. Les cellules ont été traitées ou non pendant 30 min avec la wortmannine (1 μ M) puis les expériences de vidéomicroscopie ont été réalisées en présence ou non de S1P (5 μ M) et de wortmannine (1 μ M). Les histogrammes représentent les moyennes \pm SEM de deux expériences indépendantes ($n > 150$). ns, $p > 0,05$; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ (ANOVA).

8. La S1P n'altère pas l'entrée des cellules en mitose

Pour vérifier si le raccourcissement de la durée de la mitose résultait de la régulation de processus en amont de la transition G2/M, nous avons voulu étudier si la stimulation par la S1P altère l'entrée des cellules en mitose. Pour cela, nous avons dans un premier temps réalisé une synchronisation de cellules HeLa à la transition G2/M par un traitement au RO3306 pendant 16h. Au cours des deux dernières heures de synchronisation, les cellules ont été pré-incubées avec du DMSO ou 5 μ M de S1P pour induire ses voies de signalisation. Le RO3306 a été ensuite lavé et une cinétique de relargage en mitose a été réalisée en présence de DMSO contrôle ou de S1P. Nous avons choisi de réaliser une cinétique courte dans le temps pour suivre le déroulement des étapes précoces de la mitose, à savoir la prophase et le début de la prométaphase. Les cellules ont été fixées et marquées en immunofluorescence pour déterminer l'évolution de l'index mitotique au cours du temps. Nos résultats montrent que les index mitotiques des populations cellulaires contrôle et traitée par la S1P augmentent de façon similaire indiquant qu'elles entrent en mitose avec la même cinétique au cours des 15 minutes de relargage (Figure 34A). De plus, nous avons analysé la répartition des cellules dans les phases précoces de la mitose, la prophase et la prométaphase, au cours de la cinétique de relargage. Cette répartition est similaire dans les deux populations au cours du temps, indiquant qu'elles progressent de la même façon en tout début de mitose (Figure 34B). Ainsi, le traitement par la S1P exogène ne semble pas affecter la cinétique de l'entrée en mitose ainsi que le déroulement de la prophase et l'entrée en prométaphase. Nos données suggèrent donc que le raccourcissement de la durée de la prométaphase induit par la S1P ne semble pas résulter de défauts de l'entrée en mitose mais plutôt d'événements se déroulant plus tardivement au cours de la prométaphase. En effet, après 60 min de relargage, on note une diminution significative du pourcentage de cellules en prométaphase suite au traitement par la S1P en comparaison aux cellules contrôles (Figure 34B).

Cependant, un biais a pu être introduit ici par la synchronisation en G2/M. En effet, le RO3306 étant un inhibiteur de Cdk1, il bloque l'entrée des cellules en mitose mais n'empêche pas le déroulement de nombreux événements de G2 préparatifs à l'entrée en mitose. Ainsi, les précédentes expériences ne permettent pas de déterminer si la S1P module ces événements et affecte *de facto* l'entrée en mitose. Nous avons donc décidé de réaliser un autre type de synchronisation plus en amont dans le cycle cellulaire. Nous avons effectué un double bloc thymidine pour synchroniser les cellules au début de la phase S (Ma and Poon, 2011). Brièvement, un premier bloc en présence de 2 mM de thymidine a été effectué pendant 16h puis les cellules ont été relarguées dans un milieu de culture sans thymidine pendant 8h et ont subi un second traitement de 2 mM de thymidine à nouveau pendant 16h. A l'issue de ce second bloc, les cellules ont été relarguées dans le cycle cellulaire en présence ou non de S1P et récupérées à différents temps.

Premièrement, nous avons réalisé une immunofluorescence pour déterminer l'évolution de l'index mitotique dans ces populations. Nos données montrent que l'index mitotique de la population contrôle augmente de façon similaire à celui de la population traitée par la S1P au cours du temps (Figure 34C). Dans un second temps, nous avons également suivi par analyse en cytométrie de flux le

pourcentage de cellules positives pour un marqueur mitotique, la phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 (H3^{S10P}) (Hirota et al., 2005). Au cours du relargage du double bloc thymidine, nos résultats indiquent que le taux de cellules positives pour l'H3^{S10P} augmentent également de façon similaire dans les populations contrôle et traitées par la S1P (Figure 34D).

L'ensemble de ces résultats indique donc qu'un traitement par la S1P ne semble pas affecter la cinétique de l'entrée des cellules en mitose ni leur progression jusqu'en prométaphase.

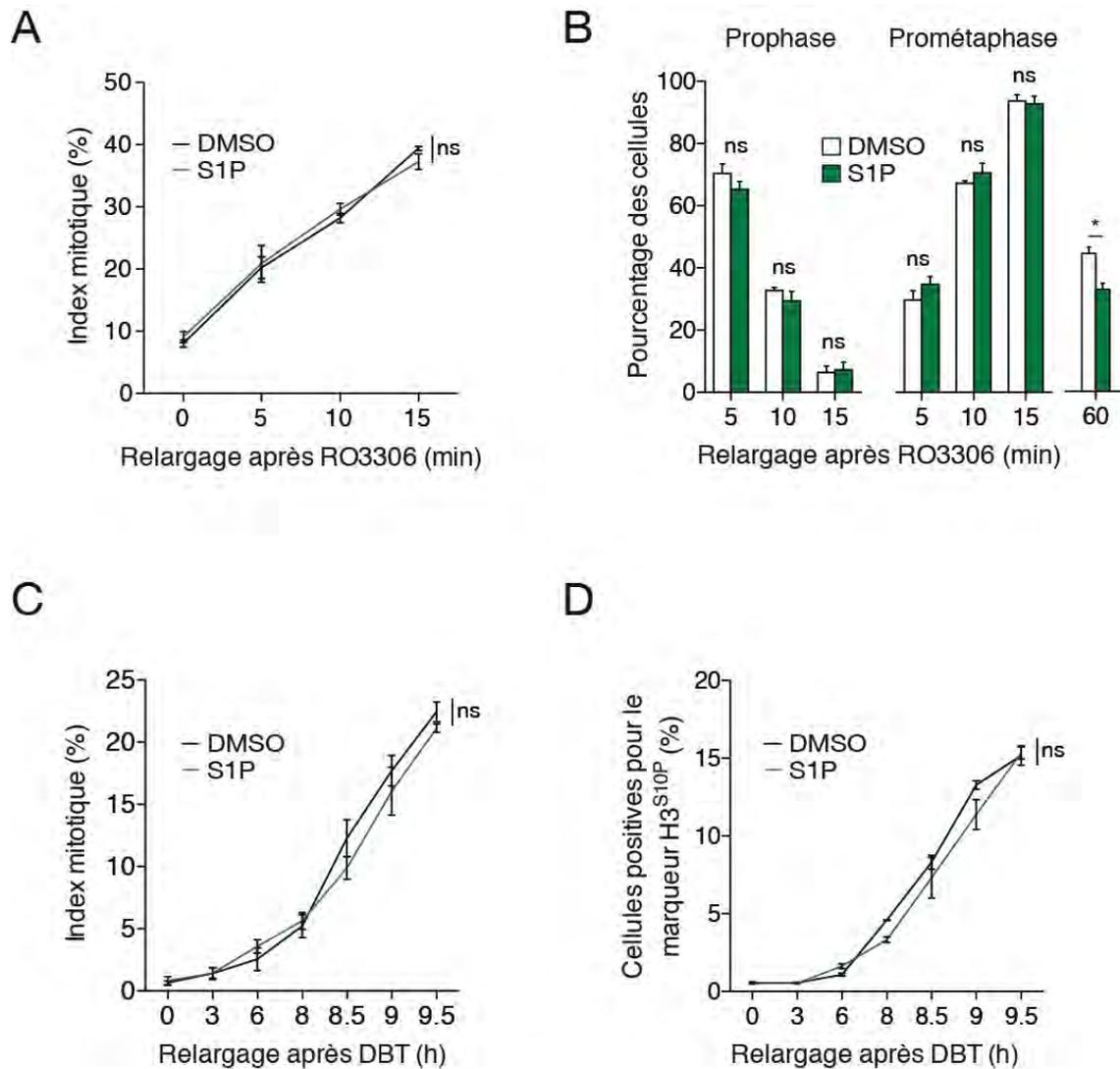


Figure 34. La S1P n'altère pas l'entrée en mitose.

(A) Evolution de l'index mitotique au cours du temps après relargage du RO3306 en présence ou non de S1P dans des cellules HeLa. Les cellules ont été synchronisées par un traitement au RO3306 (10 μ M, 16h). Au cours des deux dernières heures de la synchronisation, les cellules ont été incubées en présence ou non de 5 μ M de S1P. Les cellules ont ensuite été lavées et relarguées pendant les temps indiqués en présence ou non de 5 μ M de S1P. Le graphe représente les moyennes \pm SEM de trois expériences indépendantes. ns, $p > 0,05$ (ANOVA).

(B) Répartition des HeLa en mitose en prophase et en prométaphase au cours du temps après relargage du RO3306 en présence ou non de S1P. Les cellules ont été synchronisées par un traitement au RO3306 (10 μ M, 16h). Au cours des deux dernières heures de la synchronisation, les cellules ont été incubées en présence ou non de 5 μ M de S1P. Les cellules ont ensuite été lavées et

relarguées pendant les temps indiqués en présence ou non de 5 μM de S1P. Les histogrammes représentent les moyennes \pm SEM de trois expériences indépendantes ($n > 400$ par condition et par temps). ns, $p > 0,05$ (ANOVA).

(C) Evolution de l'index mitotique au cours des temps après relargage d'un double bloc thymidine en présence ou non de S1P. Les cellules ont été d'abord synchronisées par un double bloc thymidine (cf. Matériels et méthodes) puis relarguées pendant les temps indiqués en présence ou non de 5 μM de S1P. Le graphe représente les moyennes \pm SEM de deux expériences indépendantes. ns, $p > 0,05$ (ANOVA).

(D) Analyse par cytométrie de flux du pourcentage de cellules HeLa positives pour l' $\text{H}3^{\text{S}10\text{P}}$ au cours du temps après relargage d'un double bloc thymidine en présence ou non de S1P. Les cellules ont été d'abord synchronisées par un double bloc thymidine (cf. Matériels et méthodes) puis relarguées pendant les temps indiqués en présence ou non de 5 μM de S1P. Les cellules ont été récupérées, fixées et un immunomarquage de l' $\text{H}3^{\text{S}10\text{P}}$ a été exécuté (cf. Matériels et méthodes). Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie de flux. Le graphe représente les moyennes \pm SEM de trois expériences indépendantes. ns, $p > 0,05$ (ANOVA).

9. La surexpression des SphKs et la S1P altèrent l'alignement des chromosomes

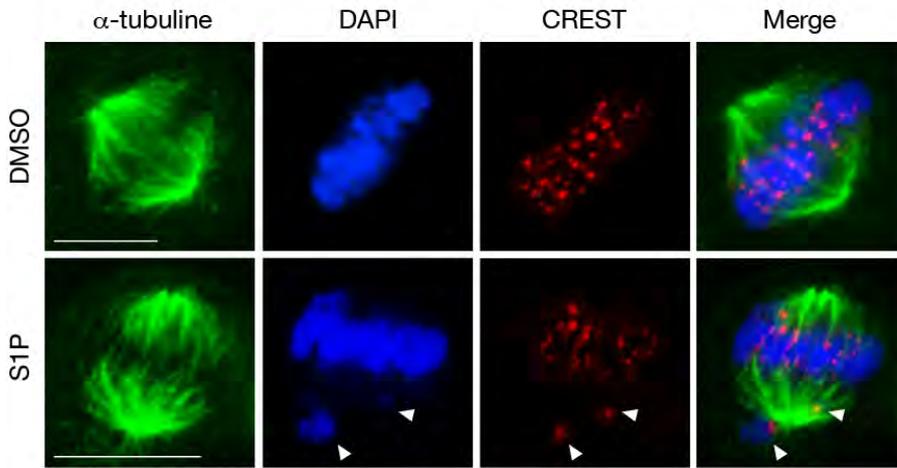
Nous avons démontré que la voie SphKs/S1P/S1P₅ régule la durée de la prométaphase. Or, c'est au cours de cette phase que les chromosomes sont capturés et alignés par le fuseau mitotique en une plaque métaphasique. Il est bien établi que la durée de la prométaphase est étroitement associée à la qualité de ces événements, notamment *via* l'activité du SAC. Nous nous sommes donc intéressés aux conséquences d'un traitement par la S1P ou de la surexpression des SphKs sur l'alignement des chromosomes.

Pour cela, nous avons synchronisé des cellules HeLa ou RPE1 à la transition G2/M à l'aide du RO3306 puis réalisé un relargage en mitose en présence ou non de S1P de façon à analyser la qualité de l'alignement des chromosomes juste avant l'entrée en anaphase. Pour cela, les cellules ont été relarguées pendant 60 min. Suite au relargage, les cellules ont été fixées et des marquages par immunofluorescence des microtubules (α -tubuline), des kinétochores (CREST) et des chromosomes (DAPI) ont permis de sélectionner les cellules et d'analyser la qualité de l'alignement des chromosomes. Nous avons comptabilisé uniquement les cellules présentant un fuseau mitotique et une plaque métaphasique matures, de façon à s'affranchir des cellules en début de prométaphase n'ayant pas encore aligné leurs chromosomes. Nous avons considéré qu'une cellule présente des défauts d'alignement de ses chromosomes lorsqu'au moins l'un d'entre eux était retrouvé hors de la plaque (Figure 35A, flèches). Des images représentatives de l'alignement chromosomique dans des cellules HeLa contrôles (DMSO) ou traitées par la S1P sont montrées dans la figure 35A. Alors qu'une faible proportion de cellules HeLa contrôles (DMSO) présentent des défauts d'alignement chromosomique ($13,9 \pm 0,8$ %), ce pourcentage est significativement augmenté dans les cellules traitées par la S1P ($24,8 \pm 0,9$ %) (Figure 35B). Ces résultats ont été reproduits dans la lignée RPE1 où le taux de cellules présentant des défauts d'alignement passe de $11,8 \pm 0,7$ % pour la condition contrôle (DMSO) à $41,9 \pm 0,3$ % pour la population traitée à la S1P (Figure 35C). Ceci indique donc que le traitement par la S1P altère la qualité de l'alignement des chromosomes.

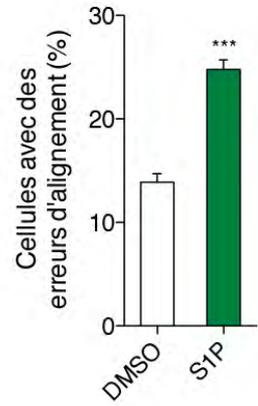
Etant donné que les populations contrôle et traitée par la S1P ne progressent pas à la même vitesse dans la mitose (Figure 27), il est possible que cela impacte la qualité de l'alignement chromosomique. Nous avons imaginé une expérience pour déterminer si la durée de la prométaphase est un facteur important pour l'alignement chromosomique. En effet, il est intéressant de savoir si de forts taux d'erreurs d'alignement des chromosomes observés notamment en présence de S1P sont corrigés si la durée de la prométaphase est allongée. Pour cela, nous avons synchronisé des cellules HeLa en G2/M comme précédemment à l'aide d'un traitement par le RO3306 puis les avons relarguées en présence d'un inhibiteur du protéasome, le MG132. L'utilisation de ce composé en mitose bloque la dégradation de nombreux régulateurs comme la cycline B1 ou la sécurine même lorsque le SAC est résolu, empêchant ainsi l'entrée en anaphase et rallongeant la durée de la prométaphase et de la métaphase (Potapova et al., 2006). Nous avons donc effectué des cinétiques de relargage en présence de MG132 et déterminé comme précédemment la qualité de l'alignement chromosomique dans des cellules contrôles (DMSO) ou traitées à la S1P. Après 60 min de relargage, la population HeLa contrôle comporte un taux modéré de cellules présentant des défauts d'alignement ($18,2 \pm 1,9$ %). Avec le temps, ce pourcentage diminue et après 120 min, il est de $11,2 \pm 2$ % (Figure 35D). En revanche, et dès 60 min de relargage, la population traitée par la S1P présente un taux plus important de cellules avec des alignements chromosomiques incorrects ($32,6 \pm 1,4$ %). De plus, de façon surprenante, on retrouve une proportion similaire après 120 min de relargage ($32,4 \pm 0,9$ %) (Figure 35D). Ces résultats indiquent donc que la proportion d'erreurs d'alignement induite par la S1P persiste tout au long de la prométaphase et de la métaphase. Ceci peut provenir d'une correction défailante de ces erreurs ou de la génération constante d'alignements incorrects.

Par vidéomicroscopie, nous avons également vérifié que le traitement par le MG132 bloquait bien les cellules en métaphase. Nos résultats indiquent que l'efficacité du MG132 pour induire l'arrêt des cellules HeLa contrôles ou traitées à la S1P est comparable et maximale dans nos conditions (Figure 35E). Nous n'avons observé aucune cellule entrant en anaphase. En parallèle, nous avons mesuré le taux de cycline B1 dans des cellules HeLa traitées par le MG132 en présence ou non de S1P de façon similaire à l'expérience décrite dans la figure 35D. Les taux de cycline B1 sont stables dans les deux conditions au cours du temps, indiquant que les cellules ne franchissent pas la métaphase (Figure 35F). L'expression comparable dans les deux conditions de l'H3^{S10P} confirme la présence de cellules en mitose dans des proportions similaires.

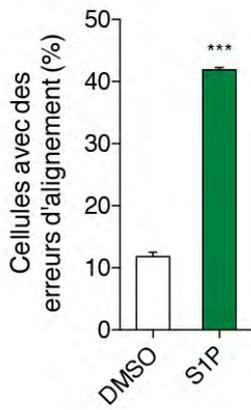
A



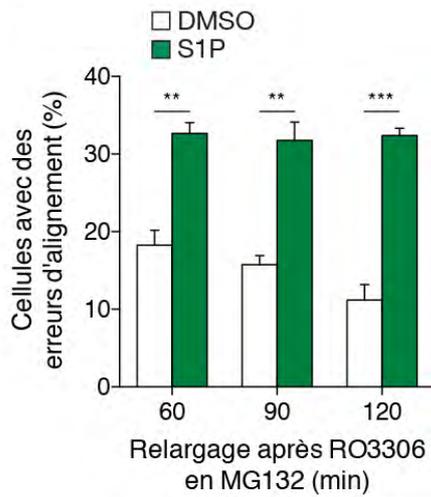
B



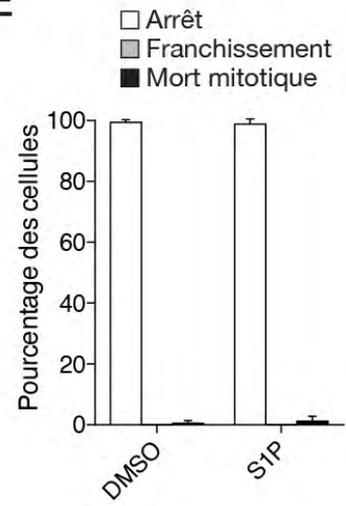
C



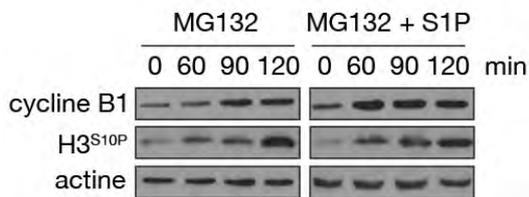
D



E



F



G

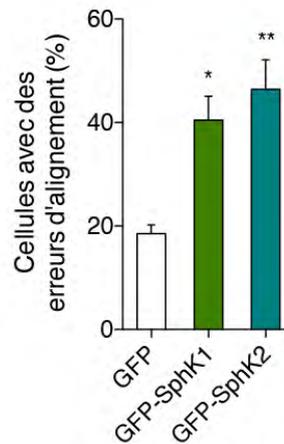


Figure 35. La surexpression des SphKs et la S1P altèrent l'alignement des chromosomes.

(A) Images représentatives de la qualité de l'alignement des chromosomes dans des cellules HeLa contrôles (DMSO) ou traitées par la S1P. Les microtubules sont marqués par l' α -tubuline (vert), l'ADN par le DAPI (bleu) et les kinétochores par le CREST (rouge). Les flèches indiquent des chromosomes mal alignés. Barre d'échelle : 10 μ m.

(B) et (C) Quantification du pourcentage de cellules HeLa (B) et RPE1 (C) en mitose présentant des défauts d'alignement. Les cellules ont été synchronisées à la transition G2/M à l'aide du RO3306 puis relarguées en mitose en présence ou non de S1P (5 μ M). Les histogrammes représentent les moyennes \pm SEM de cinq expériences indépendantes (B : DMSO, n = 958 ; S1P, n = 971 — C : DMSO, n = 1017 ; S1P, n = 1002). ***, $p < 0,001$ (test de Student).

(D) Quantification du pourcentage de cellules HeLa en mitose présentant des défauts d'alignement au cours du temps en présence de MG132. Les cellules ont été synchronisées par un traitement au RO3306 (10 μ M, 16h) puis relarguées en mitose pendant les temps indiqués en présence de MG132 (2 μ M) \pm S1P (5 μ M). Les histogrammes représentent les moyennes \pm SEM de deux expériences indépendantes (DMSO, n = 119 ; S1P, n = 94). ***, $p < 0,001$ (test de Student).

(E) Quantification de l'arrêt des cellules en présence de MG132 par vidéomicroscopie. Les cellules ont été traitées par 2 μ M de MG132 \pm 5 μ M de S1P et filmées pendant 12h. Le pourcentage de cellules arrêtées en métaphase, franchissant la métaphase ou mourant en mitose a été déterminé. Les histogrammes représentent les moyennes \pm SEM de deux expériences indépendantes (DMSO, n = 85 ; S1P, n = 42).

(F) Les cellules HeLa ont été synchronisées à la transition G2/M par le RO3306 puis relarguées en mitose pendant les temps indiqués (min) en présence de MG132 (2 μ M) \pm S1P (5 μ M). L'expression de la cycline B1 et de l'H3^{S10P} ont été évaluées par Western blot. Le résultat d'une expérience représentative parmi trois indépendantes est représenté.

(G) Quantification du pourcentage de cellules HeLa en mitose surexprimant les GFP-SphKs présentant des défauts d'alignement. Les cellules ont été transfectées pendant 48h avant d'être synchronisées et relarguées en mitose pendant 60 min en présence de MG132 (2 μ M). Seules les cellules GFP positives ont été évaluées. Les histogrammes représentent les moyennes \pm SEM de deux expériences indépendantes (GFP, n = 224 ; GFP-SphK1, n = 198 ; GFP-SphK2, n = 206). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ (ANOVA).

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'effet de la surexpression transitoire des SphKs sur la qualité de l'alignement chromosomique. De façon similaire aux expériences réalisées précédemment, nous avons synchronisé des cellules HeLa surexprimant la GFP seule ou les GFP-SphKs à la transition G2/M puis les avons relarguées en mitose et réalisé des expériences d'immunofluorescence pour analyser l'alignement des chromosomes. Seules les cellules positives pour la GFP et en métaphase ont été analysées. De façon similaire au traitement par de la S1P exogène, la surexpression de la GFP-SphK1 ou de la GFP-SphK2 induisent une augmentation significative du pourcentage de cellules présentant des défauts d'alignement chromosomique par rapport à la condition contrôle ($40,4 \pm 4,6$ % et $46,4 \pm 5,7$ % *versus* $18,5 \pm 1,6$ % respectivement) (Figure 35G).

L'ensemble de ces résultats démontre que la surexpression des SphKs et la stimulation par la S1P altère la qualité de l'alignement des chromosomes en métaphase. Or, la persistance de telles erreurs peut altérer la ségrégation des chromosomes entre les deux cellules filles.

10. La surexpression des SphKs et la S1P altèrent la ségrégation des chromosomes

Nous avons ensuite évalué les conséquences de la surexpression des SphKs ou de la S1P sur la qualité de la ségrégation chromosomique. Pour cela, nous avons reproduit la série d'expériences décrite précédemment. Des cellules traitées ou non par la S1P ou surexprimant la GFP seule ou les GFP-SphKs ont été synchronisées à la transition G2/M puis relarguées en mitose suffisamment longtemps pour permettre leur progression au-delà de la métaphase (90 min pour les HeLa, 40 min pour les RPE1). Nous avons donc évalué la qualité de la ségrégation chromosomique dans des cellules en anaphase ou dans des phases plus tardives pour observer les conséquences des défauts d'alignement constatés précédemment.

Dans un premier temps, nous avons calculé la fréquence de chromosomes dits retardés (*lagging chromosomes*). Ils résultent d'attachements incorrects appelés mérotéliques où chaque pôle du fuseau capture le même kinétochore d'un chromosome. Ainsi, les forces de traction opposées nécessaires à la ségrégation s'annulent et le chromosome reste entre les deux cellules filles. Ces attachements incorrects sont résolus par la machinerie de correction impliquant notamment Aurora B et leur persistance lors de l'anaphase peut générer de l'aneuploïdie (Holland and Cleveland, 2012).

Dans nos expériences, nous avons calculé que les cellules HeLa contrôles (DMSO) présentent un faible taux de chromosomes retardés en anaphase ou en télophase ($8,6 \pm 1,9$ %). Ce pourcentage est significativement augmenté d'un facteur 3,5 dans les cellules traitées par la S1P ($29,4 \pm 1,5$ %) (Figure 36A). Ces résultats ont été reproduits dans la lignée RPE1 (Figure 36B). De même, alors que les cellules HeLa surexprimant la GFP seule présentent peu de chromosomes retardés ($8,7 \pm 0,9$ %), cette proportion est significativement plus forte dans les cellules surexprimant la GFP-SphK1 ou la GFP-SphK2 ($25,4 \pm 3,6$ % et $25,2 \pm 1,9$ % respectivement) (Figure 36C).

De plus, nous avons quantifié la fréquence de ponts chromosomiques dans nos populations. Si un attachement mérotélique n'est pas corrigé, un chromosome retardé est généré. Les forces de traction exercées par le fuseau sont opposées et induisent la rupture de l'attachement de façon aléatoire. Cela peut notamment endommager le chromosome (Holland and Cleveland, 2012; Vitre and Cleveland, 2012). La conséquence de cette rupture est l'apparition d'une structure appelée pont chromosomique entre les deux cellules filles. Le chromosome endommagé est étiré et un fragment est visible au niveau du fuseau central en anaphase et télophase. L'anneau contractile d'actine/myosine lors de la cytokinèse, et l'abscission des deux cellules filles rompent à nouveau le chromosome s'il demeure dans le plan de clivage (Holland and Cleveland, 2012; Vitre and Cleveland, 2012).

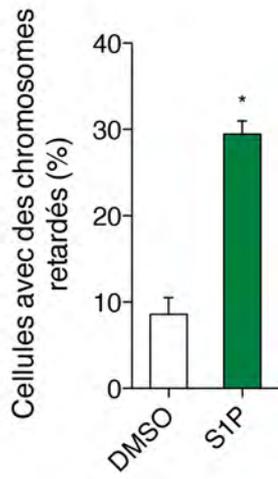
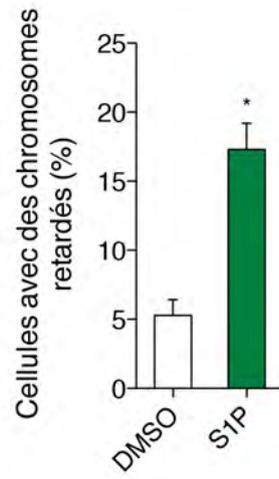
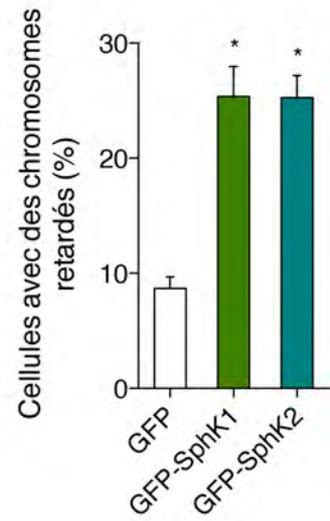
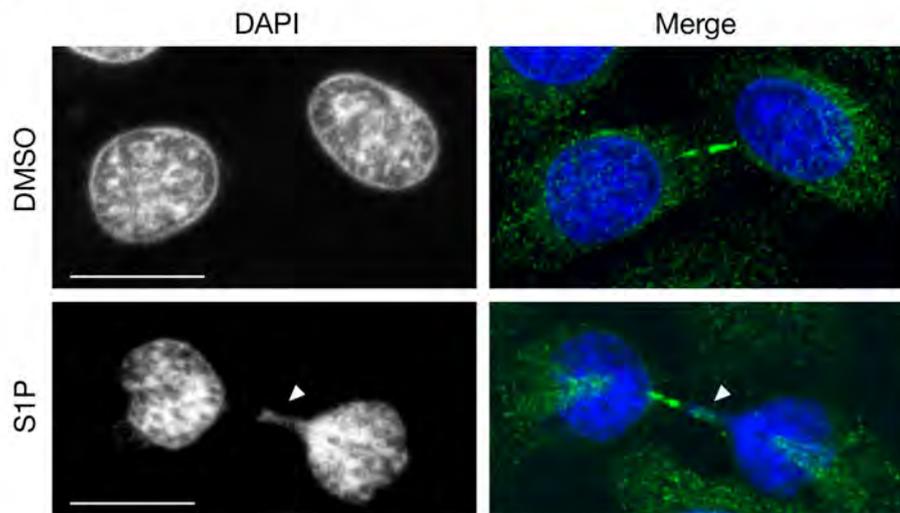
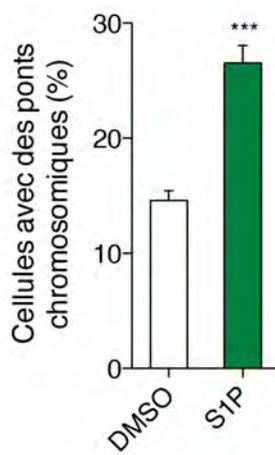
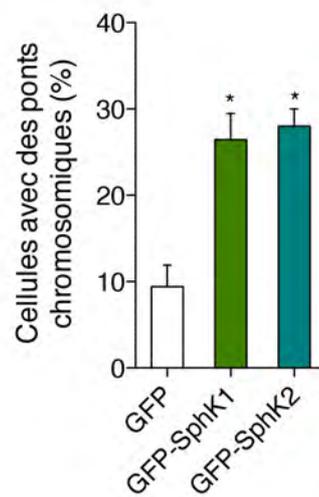
A**B****C****D****E****F**

Figure 36. La surexpression des SphKs et la S1P altèrent la ségrégation des chromosomes.

(A) et (B) Quantification du pourcentage de cellules HeLa (A) et RPE1 (B) présentant des chromosomes retardés en présence de S1P. Les cellules ont été synchronisées à la transition G2/M à l'aide du RO3306 puis relarguées en mitose pendant 90 min (HeLa) ou 40 min (RPE1) en présence ou non de S1P (5 μ M). Les histogrammes représentent les moyennes \pm SEM de deux expériences indépendantes (A : DMSO, n = 229 ; S1P, n = 255 — B : DMSO, n = 208 ; S1P, n = 243). *, $p < 0,05$ (test de Student)

(C) Quantification du pourcentage de cellules HeLa surexprimant les GFP-SphKs présentant des chromosomes retardés. Les cellules ont été transfectées pendant 48h avant d'être synchronisées et relarguées en mitose pendant 90 min. Seules les cellules GFP positives ont été évaluées. Les histogrammes représentent les moyennes \pm SEM de deux expériences indépendantes (GFP, n = 234 ; GFP-SphK1, n = 202 ; GFP-SphK2, n = 212). *, $p < 0,05$ (ANOVA).

(D) Images représentatives de la qualité de la ségrégation des chromosomes dans des cellules HeLa contrôles (DMSO) ou traitées par la S1P. Les microtubules sont marqués par l' α -tubuline (vert) et l'ADN par le DAPI (bleu). La flèche indique un pont chromosomique. Barre d'échelle : 10 μ m.

(E) Quantification du pourcentage de cellules HeLa présentant des ponts chromosomiques en présence de S1P. Les cellules ont été synchronisées et relarguées en mitose pendant 120 min en présence ou non de S1P (5 μ M). Les histogrammes représentent les moyennes \pm SEM obtenues à partir de six expériences indépendantes (DMSO, n = 785 ; S1P, n = 881). ***, $p < 0,001$ (test de Student).

(F) Quantification du pourcentage de cellules HeLa surexprimant les GFP-SphKs présentant des ponts chromosomiques. Les cellules ont été transfectées pendant 48h avant d'être synchronisées et relarguées en mitose pendant 120 min. Seules les cellules GFP positives ont été évaluées. Les histogrammes représentent les moyennes \pm SEM de deux expériences indépendantes (GFP, n = 417 ; GFP-SphK1, n = 487 ; GFP-SphK2, n = 478). *, $p < 0,05$ (ANOVA).

La figure 36D représente des images représentatives de cellules HeLa contrôles (DMSO) ou traitées par la S1P en cytocinèse. Le marquage de l'ADN (DAPI) et des microtubules (α -tubuline) permettent d'identifier les chromosomes retardés (flèche). La quantification révèle que le traitement par la S1P induit une augmentation significative de la proportion de cellules HeLa présentant des ponts chromosomiques ($26,6 \pm 1,5$ % *versus* $14,6 \pm 0,8$ % respectivement) (Figure 36E). De même, alors que la population surexprimant la GFP seule ne contient que peu de cellules avec des ponts chromosomiques ($9,4 \pm 2,5$ %), ce pourcentage est fortement augmenté par la surexpression de la GFP-SphK1 ou de la GFP-SphK2 ($26,5 \pm 3$ % et 28 ± 2 % respectivement) (Figure 36F).

L'ensemble de ces résultats démontre que la surexpression des SphKs et la S1P altèrent la qualité de la ségrégation chromosomique. Nous posons donc l'hypothèse que les défauts d'alignement induits par la S1P ne sont pas corrigés en prométaphase (Figure 16) altérant ainsi la ségrégation chromosomique.

11. La S1P semble diminuer l'activité du SAC

Nous avons démontré que la surexpression des SphKs et la S1P raccourcissent la durée de la prométaphase (Figures 22 et 27). Or, ces conditions induisent également des anomalies d'alignement des chromosomes qui semblent persister et qui altèrent la qualité de la ségrégation chromosomique. Les erreurs d'alignement résultent d'attachements incorrects qui maintiennent l'activité du SAC, allongeant la durée de la prométaphase pour permettre leur correction. Nous nous sommes alors demandé si la S1P affecte l'activité du SAC.

La surexpression des SphKs et la S1P diminuent l'index mitotique en présence de nocodazole dans des cellules HeLa et RPE1 (Figures 21D, 27C et données non montrées). Ces résultats suggèrent que le traitement par la S1P altère l'activité du SAC dans les cellules, les faisant rentrer illégitimement en anaphase en présence de poisons du fuseau mitotique. De plus, la dégradation de la cycline B1, événement marquant l'inactivation du SAC, est anticipée dans les cellules traitées par la S1P (Figure 27F) ou surexprimant les SphKs (Figure 3D) par rapport aux cellules contrôles. L'ensemble de ces résultats semble donc indiquer que la surexpression des SphKs ou la stimulation par la S1P diminuent l'activité du SAC, raccourcissant ainsi la durée de la prométaphase.

Nous avons donc voulu étudier la signalisation du SAC en conditions de traitement par la S1P. Nous avons quantifié la localisation aux kinétochores d'effecteurs du SAC comme Mad2 et BubR1 en présence de nocodazole. Ce poison du fuseau désassemble tous les microtubules, bloquant *de facto* la formation d'attachements kinétochores-microtubules. Dans ces conditions, nous nous attendons donc à une présence importante de Mad2 et de BubR1 aux kinétochores libres. Nous avons donc synchronisé des cellules HeLa à la transition G2/M par le RO3306 comme précédemment puis les avons relarguées en nocodazole pendant 60 min en présence ou non de S1P. Les cellules ont ensuite été fixées et nous avons analysé la localisation au niveau des kinétochores de Mad2 et de BubR1 par immunofluorescence. Brièvement, nous avons réalisé des acquisitions en z à l'aide d'un microscope confocal pour imager la totalité de la hauteur des cellules. Les kinétochores ont été visualisés à l'aide d'un marquage avec du sérum de patient atteint du syndrome de CREST (maladie auto-immune qui cible les centromères). Pour l'analyse, une projection de tous les plans en une seule image a été générée. Pour chaque kinétochore, nous avons défini une ROI (*Region Of Interest*) et déterminé l'intensité de fluorescence du CREST. Les ROIs ont ensuite été transposées sur les projections des marqueurs Mad2 ou BubR1 et l'intensité des fluorescences ont été calculées (Gao et al., 2011; Posch et al., 2010). Après soustraction du bruit de fond, nous avons déterminé le ratio Mad2/CREST et BubR1/CREST pour décrire la localisation kinétochorienne de ces protéines. Pour faciliter l'analyse, nous avons programmé une macro fonctionnant sous le logiciel ImageJ (cf. Annexe). Les figures 37 A et 37C sont des projections représentatives d'acquisitions en z décrivant la localisation de Mad2 et BubR1 (vert) au niveau des kinétochores (CREST, rouge) dans des cellules HeLa contrôles (DMSO) ou traitées par la S1P. Notre analyse quantitative révèle qu'en présence de nocodazole, la localisation kinétochorienne de Mad2 est significativement réduite de près de 40% dans les cellules traitées par la S1P en comparaison aux cellules contrôles (Figure 37B). De même, la proportion de BubR1 au niveau des kinétochores est moindre dans ces cellules (Figure 37D).

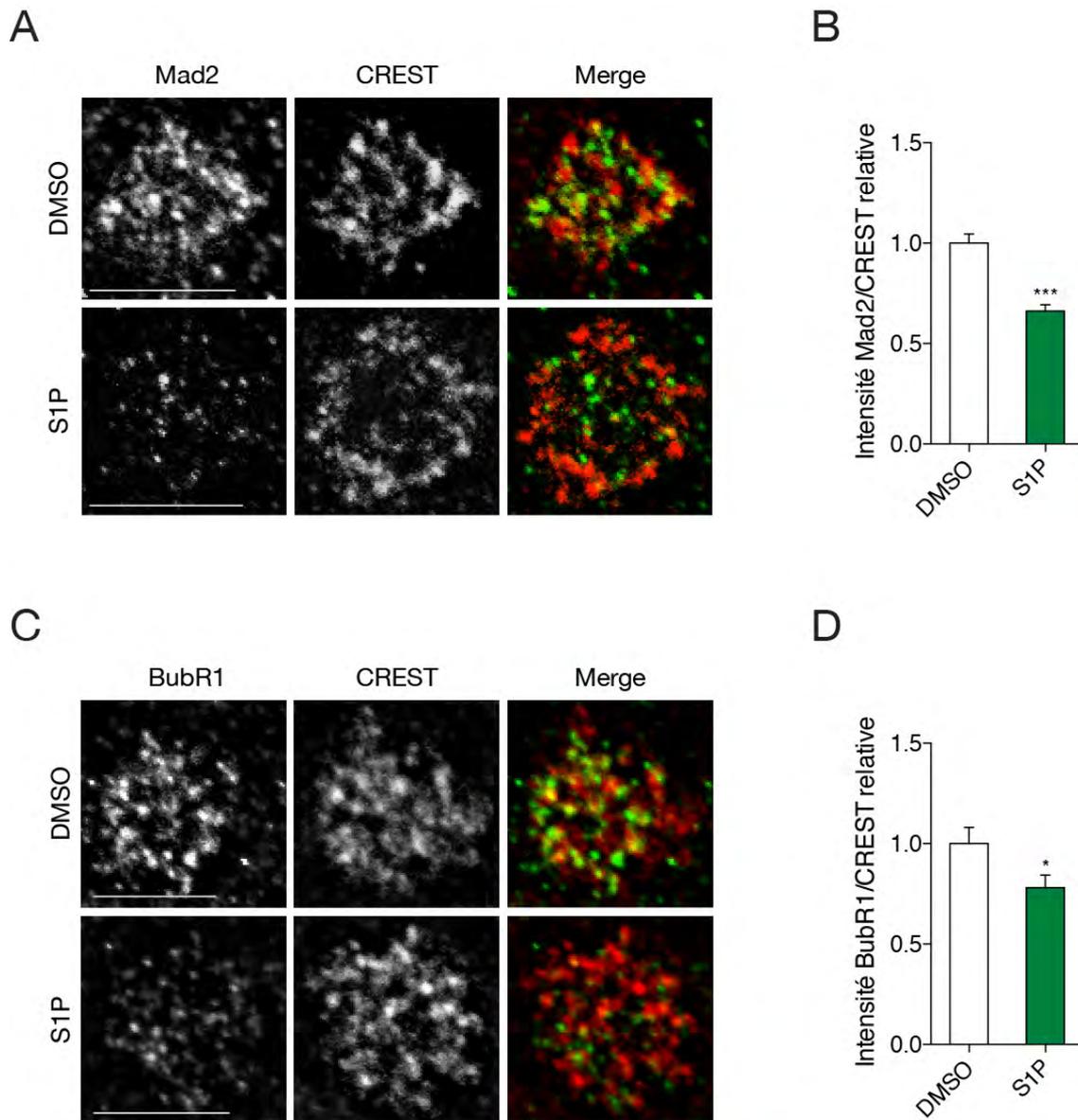


Figure 37. La S1P affecte la localisation kinétochorienne de Mad2 et de BubR1.

(A) Projections d'acquisitions en z représentatives de la localisation de Mad2 au niveau des kinétochores dans des cellules HeLa contrôles (DMSO) ou traitées par la S1P. Mad2 est marquée en vert, les kinétochores en rouge (CREST). Barre d'échelle : 10 μ m.

(B) Quantification de la localisation kinétochorienne de Mad2 en présence de S1P. Les cellules HeLa ont été synchronisées au RO3306 pendant 16h puis relarguées en mitose en présence de nocodazole (0,2 μ g/ml) \pm S1P (5 μ M) pendant 60 min. L'intensité du signal Mad2/CREST a été calculée. Les histogrammes représentent les moyennes \pm SEM de deux expériences indépendantes (DMSO, n = 201 kinétochores ; S1P, n = 161). ***, $p < 0,001$ (test de Student).

(C) Projections d'acquisitions en z représentatives de la localisation de BubR1 au niveau des kinétochores dans des cellules HeLa contrôles (DMSO) ou traitées par la S1P. BubR1 est marquée en vert, les kinétochores en rouge (CREST). Barre d'échelle : 10 μ m.

(D) Quantification de la localisation kinétochorienne de BubR1 en présence de S1P. Les cellules HeLa ont été synchronisées au RO3306 puis relarguées en mitose pendant 16h en présence de nocodazole (0,2 μ g/ml) \pm S1P (5 μ M) pendant 60 min. L'intensité du signal BubR1/CREST a été calculée. Les histogrammes représentent les moyennes \pm SEM de deux expériences indépendantes (DMSO, n = 255 kinétochores ; S1P, n = 118). *, $p < 0,05$ (test de Student).

L'ensemble de ces résultats indique qu'en présence de poisons du fuseau comme le nocodazole, le traitement par la S1P induit une diminution de la localisation kinétochorienne des protéines effectrices du SAC Mad2 et BubR1. Comme le nocodazole désassemble tous les microtubules, la baisse de la présence de ces protéines au niveau des kinétochores ne peut pas résulter de l'établissement d'attachements entre les kinétochores et les microtubules. Ces résultats suggèrent que la S1P diminue l'activité du SAC en réduisant la proportion de ses acteurs Mad2 et BubR1 au niveau des kinétochores d'où ils signalent le blocage de la progression mitotique. Ceci pourrait expliquer pourquoi la surexpression des SphKs et la S1P raccourcit la durée de la prométaphase malgré la présence d'erreurs d'alignement des chromosomes.

12. La S1P semble réduire la réponse des cellules aux poisons du fuseau mitotique

Les poisons du fuseau mitotique comme le nocodazole ou le taxol sont des composés qui ciblent les microtubules, induisant leur dépolymérisation ou au contraire les stabilisant, ce qui bloque leur dynamique. Ainsi, ils empêchent l'établissement du fuseau mitotique ou la séparation des chromatides sœurs. Il est décrit que ces poisons du fuseau arrêtent les cellules en mitose par une activation soutenue du SAC. Si cette incubation est prolongée, les cellules meurent en mitose ou échappent au SAC et s'engagent en apoptose post-mitotique (Brito and Rieder, 2006a; Galan-Malo et al., 2012; Huang et al., 2009; Marzo and Naval, 2013). Nos résultats suggèrent que la S1P réduit l'activité du SAC. Nous nous sommes alors demandés si la S1P peut altérer la réponse des cellules aux poisons du fuseau.

Des cellules HeLa asynchrones ont subi un traitement au nocodazole ou au taxol en présence ou non de S1P et ont été récupérées en cinétique. L'index mitotique de ces populations a été évalué comme précédemment. Suite à un traitement par le nocodazole pendant des temps courts (6–24h), les cellules sont arrêtées en mitose et l'index mitotique augmente (Figure 38A). Au bout de 36h de traitement, l'index mitotique se réduit, sans doute sous l'effet de l'induction de la mort cellulaire en réponse au nocodazole (Figure 38A). Cependant, nous avons observé à chaque point de notre cinétique un index mitotique significativement réduit d'environ 30% dans la population cellulaire traitée par la S1P en comparaison à celle contrôle (Figure 38A).

Nous avons également réalisé cette expérience en présence de taxol. Le taxol bloque la dynamique des microtubules nécessaire à l'établissement d'attachements corrects entre kinétochores et microtubules et à la séparation des chromatides sœurs (Jordan and Wilson, 2004). De plus, il active le SAC en réduisant la tension kinétochorienne (Musacchio and Salmon, 2007). De façon similaire, l'index mitotique de populations cellulaires HeLa traitées par le taxol augmente au cours des heures précoces du traitement. Néanmoins, le pourcentage de cellules en mitose est significativement réduit de 20% en moyenne tout au long de notre cinétique en présence de S1P en comparaison à la condition contrôle (Figure 38B).

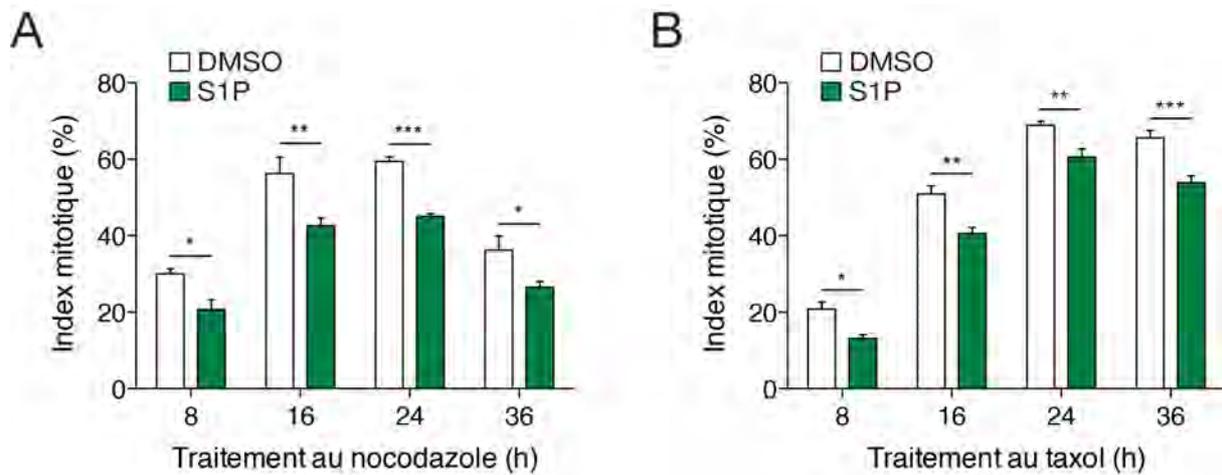


Figure 38. La S1P réduit l'arrêt des cellules en mitose suite au traitement par des poisons du fuseau mitotique.

(A) Evolution de l'index mitotique au cours du temps en présence de nocodazole (150 mM) \pm S1P (5 μ M) dans une population cellulaire HeLa asynchrone. Le graphe représente les moyennes \pm SEM de deux expériences indépendantes ($n > 500$). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ (ANOVA).

(B) Evolution de l'index mitotique au cours du temps en présence de taxol (50 nM) \pm S1P (5 μ M) dans une population cellulaire HeLa asynchrone. Le graphe représente les moyennes \pm SEM de deux expériences indépendantes ($n > 500$). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ (ANOVA).

Ces résultats sont préliminaires et il convient notamment de déterminer si la diminution de l'index mitotique dans les cellules traitées par la S1P n'est pas due à une induction de la mort en mitose. Néanmoins, en absence de poisons du fuseau mitotique, aucune mortalité cellulaire en mitose n'a été observée lors des expériences de vidéomicroscopie en présence de S1P. Ces données préliminaires indiquent que le traitement par la S1P diminue l'accumulation des cellules en mitose induite par le nocodazole ou le taxol. Ceci suggérerait qu'en présence de S1P, les cellules pourraient échapper à ces poisons, ce qui constituerait un mécanisme de résistance. Néanmoins, des expériences complémentaires sont nécessaires pour préciser cette hypothèse.

Discussion générale

La voie SphKs/S1P est largement impliquée dans la régulation de processus fondamentaux comme la prolifération cellulaire, la survie, la migration ou encore l'adaptation aux stress environnementaux comme l'hypoxie (Ader et al., 2008; Cuvillier et al., 2010; Maceyka et al., 2012). Dans la littérature, plusieurs études ont impliqué la voie SphKs/S1P dans la régulation du cycle cellulaire. Notamment, il a été décrit un rôle dans la régulation de l'expression des inhibiteurs de Cdks p21 et p27^{Kip1} et de l'activité de Cdk2 (Gao and Smith, 2011; Xia et al., 2012). De plus, leur localisation intracellulaire au niveau des centrosomes ont suggéré qu'elles régulent le processus de division cellulaire en participant par exemple à l'établissement du fuseau mitotique (Gillies et al., 2009).

Au cours de notre étude, nous avons mis en évidence pour la première fois les rôles de la voie SphKs/S1P dans la régulation de la progression mitotique, le fonctionnement du SAC et la ségrégation chromosomique. Dans cette partie, nous proposerons une réflexion sur nos résultats et mettrons nos travaux en perspective.

1. La voie de signalisation SphKs/S1P/S1P₅ régule la progression en mitose

1.1. Les SphKs et la S1P

Nos résultats indiquent que la surexpression des SphKs ou le traitement par de la S1P exogène induisent un raccourcissement de la durée de la prométaphase (Figures 22 et 27). A l'inverse, la déplétion des SphKs par interférence ARN ou leur inhibition pharmacologique retardent la sortie de la prométaphase (Figures 24–26). La S1P peut agir de façon extracellulaire en interagissant avec ses cinq récepteurs S1PRs mais également de manière intracellulaire (Maceyka et al., 2012). De façon intéressante, la neutralisation de la S1P par l'utilisation d'un anticorps innovant, le Sphingomab™ (Visentin et al., 2006) prolonge également la durée de la prométaphase (Figure 28). Aucun mécanisme d'import de cet anticorps dans les cellules n'a été décrit à ce jour, suggérant donc qu'il ne neutralise que le pool de S1P extracellulaire. Nous avons donc déduit que la régulation de la progression mitotique par les SphKs requiert la production de S1P et son export hors des cellules. La régulation de la sécrétion de la S1P par les cellules ne sont pas parfaitement connus à ce jour mais des acteurs moléculaires ont été identifiés : la famille des transporteurs ABC, notamment ABCA1, ABCC1 et ABCG2 (Sato et al., 2007; Takabe et al., 2010) et de façon plus spécifique, le transporteur Spns2 (Hisano et al., 2011; Kawahara et al., 2009). Leur implication dans le contrôle de la mitose par la voie SphKs/S1P est donc à évaluer.

Une étude récente a suggéré que l'inhibition de la SphK1 altère le déroulement de la cytokinèse, ce qui induirait la formation de cellules tétraploïdes dans une lignée de cancer du sein (Kotelevets et al., 2012). Cependant, dans nos conditions, nous n'avons observé aucun défaut de cytokinèse au cours

des expériences de vidéomicroscopie dans des populations HeLa ou RPE1 déplétées pour les SphKs ou inhibées pour la SphK1 (Figures 24–26). Il est possible cependant que ces différences phénotypiques soient liées aux modèles cellulaires utilisés. De plus, leurs conclusions reposent sur la mesure du contenu en ADN par cytométrie de flux en observant les pics d'iodure de propidium. Or, il est possible que cette technique induise un biais lors de l'analyse.

1.2. Le récepteur S1P₅

Nous avons également caractérisé que l'expression du récepteur S1P₅ est requise pour que la voie SphKs/S1P module la mitose. En effet, la déplétion de ce récepteur à la S1P prolonge la durée de la prométaphase (Figure 30). En outre, l'effet de la S1P est aboli dans des cellules déplétées pour le S1P₅, suggérant que seul ce récepteur est impliqué la signalisation de la voie SphKs/S1P pour réguler la progression mitotique (Figure 31). Ces résultats sont particulièrement intéressants car historiquement, le récepteur S1P₅ est décrit comme ayant un profil d'expression restreint dans l'organisme étant principalement exprimé dans le cerveau, la rate, les poumons, le placenta et les leucocytes du sang périphérique (Im et al., 2001). Cependant, nous avons détecté l'expression de son ARNm et de la protéine dans un large spectre de lignées cellulaires disponibles au laboratoire, qu'elles soient transformées, immortalisées ou primaires (Figure 29 et données non montrées). Ses fonctions biologiques sont peu décrites et concernent à ce jour les cellules du système nerveux central. Le S1P₅ induirait la survie des oligodendrocytes (Jaillard et al., 2005) et participerait à la fonction de la barrière endothéliale au niveau du cerveau (van Doorn et al., 2012). Le S1P₅ est également impliqué dans la circulation des cellules NK (*Natural Killer*) (Mayol et al., 2011; Walzer et al., 2007). Nous avons décrit ici que le S1P₅ participe au contrôle d'un processus fondamental : la mitose.

1.3. En aval du récepteur S1P₅

Le récepteur S1P₅ est couplé à différentes protéines G, régulant ainsi plusieurs voies de signalisation dont celles de la PLC/IP₃/Ca²⁺, PI3K/Akt, des GTPases Rho, de l'adénylate cyclase et de Erk1/2 (Gonda et al., 1999; Im et al., 2001; Jaillard et al., 2005; Malek et al., 2001; Novgorodov et al., 2007). Nous avons testé l'implication de deux de ces voies en aval du S1P₅ dans la régulation de la mitose.

De façon similaire à la neutralisation de la S1P, l'inhibition de Erk1/2 par l'U0126 retarde la sortie de la prométaphase (Figure 32). Cependant, dans des cellules inhibées pour Erk1/2, la S1P induit toujours un raccourcissement de la durée de la prométaphase. De plus, le traitement par la S1P ne conduit pas à l'activation d'Erk1/2 en présence de l'inhibiteur U0126 (Figure 32A). Ces résultats suggèrent ainsi que Erk1/2 n'est pas impliquée en aval du S1P₅ pour réguler la progression mitotique. Les implications de la voie MAPK au cours de la mitose sont nombreuses dans le contrôle de l'entrée en mitose, de l'assemblage du fuseau, de la progression mitotique ou encore de la fonction du SAC (Eves et al., 2006; Guadagno and Ferrell, 1998; Hayne et al., 2000; Roberts et al., 2002; Takenaka et al., 1997; Wright et al., 1999). L'effet de l'inhibition de Erk1/2 peut donc être la résultante d'une

conséquence de défauts multiples. Erk1/2 est un acteur majeur de l'activation de la SphK1 par sa phosphorylation sur le résidu S225 (Pitson et al., 2003). Il est donc possible que l'allongement de la durée de la prométaphase observé suite à l'inhibition d'Erk1/2 soit dû en partie à la diminution de l'activité de la SphK1. Cette hypothèse est à vérifier.

Nous avons également testé l'implication de la signalisation des PI3Ks/Akt dans la régulation de la mitose en aval de la voie SphKs/S1P/S1P₅. De façon analogue à la neutralisation de la S1P, l'inhibition des PI3Ks prolonge significativement la durée de la prométaphase (Figure 33). Cette famille de kinases jouent également des rôles importants dans le contrôle de la ségrégation des chromosomes ou la cytokinèse (Garcia et al., 2006; Sillio et al., 2012). Leur inhibition peut donc induire plusieurs défauts qui retardent la progression mitotique. De façon intéressante, l'effet de la S1P sur la durée de la prométaphase est aboli dans des cellules traitées par des inhibiteurs des PI3Ks. Nos données indiquent donc que l'axe SphKs/S1P/S1P₅ requiert l'activité de la voie des PI3Ks pour réguler la durée de la mitose. Notre hypothèse est que la voie PI3K/Akt puisse agir en aval de l'axe SphKs/S1P/S1P₅ pour contrôler la progression mitotique. Il est également possible que ces deux voies de signalisation agissent en synergie sans relation épistatique particulière. Nous voulons notamment mesurer la modulation de l'activité de la voie PI3K/Akt et de ses cibles par la S1P en mitose afin de comprendre comment les signalisations des PI3Ks et de la S1P sont imbriquées.

2. Régulation de l'activité du SAC par la voie SphKs/S1P

Nos données montrent que la voie SphKs/S1P régule la progression mitotique en jouant un rôle lors de la prométaphase. La durée de la prométaphase dépend du SAC. Activé dès l'entrée en mitose, ce point de contrôle doit être résolu pour la progression de la mitose au-delà de la métaphase. L'inactivation du SAC n'a lieu que lorsque la totalité des chromosomes sont capturés et alignés par le fuseau mitotique au niveau de la plaque métaphasique (Musacchio and Salmon, 2007). Ainsi, la durée de la prométaphase est fonction du temps qu'il faut à la cellule pour capturer et aligner l'ensemble de ses chromosomes et ce temps lui est fourni par l'activité du SAC. Cependant, nos résultats indiquent que la surexpression des SphKs et le traitement par la S1P raccourcissent la durée de la prométaphase (Figures 22 et 27) mais altèrent également la qualité de l'alignement des chromosomes (Figure 35). Ces deux observations suggèrent donc que la surexpression de la voie SphKs/S1P provoque une inactivation précoce du SAC dans des conditions qui normalement maintiennent son activité. La description de la régulation moléculaire de l'activité du SAC par la voie SphKs/S1P est cruciale pour la compréhension de leur contrôle de la progression mitotique et de la ségrégation chromosomique.

Les kinétochores sont les plateformes centrales de l'activité du SAC. Ces structures spécialisées sont assemblées en mitose au niveau des centromères des chromatides sœurs. Ils sont composés

d'un grand nombre de protéines qui forment différents niveaux d'organisation permettant notamment l'interaction avec les microtubules (Figure 8) (Musacchio and Salmon, 2007). Au niveau des kinétochores libres, de nombreux effecteurs du SAC comme Mps1, Mad1, Mad2, Bub1 ou encore BubR1 sont recrutés pour signaler l'arrêt de la progression mitotique (Musacchio and Salmon, 2007). La hiérarchie et la régulation du recrutement de ces différentes protéines sont complexes. Il apparaît que l'enrichissement kinétochorien de deux régulateurs primordiaux du SAC, Aurora B et Mps1, est crucial pour le recrutement des autres effecteurs du SAC et leur signalisation (Heinrich et al., 2012; Hewitt et al., 2010; Shepperd et al., 2012; Xu et al., 2009; Yamagishi et al., 2012). Aurora B et Mps1 agissent en coopération pour être recrutées au kinétochore. La localisation d'Aurora B au kinétochore dépend notamment de la phosphorylation de l'histone H3 sur la T3 par la kinase Haspin ainsi que celle de l'histone H2A sur la T120 par Bub1. La phosphorylation de ces histones permet la liaison avec les protéines Survivin et Borealin, partenaires d'Aurora B avec qui elles forment le complexe CPC (*Chromosome Passenger Complex*) (Kelly et al., 2010; Vader et al., 2006; Wang et al., 2010a; Yamagishi et al., 2010). Chez les métazoaires, le recrutement de Mps1 au kinétochore dépend de l'activité d'Aurora B (Heinrich et al., 2012; Santaguida et al., 2010; Saurin et al., 2011; Vigneron et al., 2004). Mps1 phosphoryle la Borealin pour activer Aurora B (Jelluma et al., 2008). De plus, Mps1 participe au recrutement d'Aurora B induit par l'intermédiaire de Bub1 (van der Waal et al., 2012).

Mps1 joue un rôle prépondérant dans le recrutement des autres protéines du SAC au niveau du kinétochore comme Mad1, Mad2, Bub1 ou Bub3 (Abrieu et al., 2001; Kwiatkowski et al., 2010; Maciejowski et al., 2010; Santaguida et al., 2010). Mps1 phosphoryle KNL-1 au kinétochore, permettant le recrutement de Bub1 et de Bub3, mais également de Mad1 et de BubR1 (London et al., 2012; Rischitor et al., 2007; Shepperd et al., 2012; Vanoosthuyse et al., 2004; Yamagishi et al., 2012). Mps1 permet également le recrutement du complexe RZZ (Rod-Zwilch-ZW10) requis pour recruter Mad1 (Kiyomitsu et al., 2007; Kops et al., 2005).

L'inactivation du SAC est déclenchée par la capture des kinétochores et l'alignement des chromosomes par les microtubules du fuseau mitotique (Foley and Kapoor, 2013; Musacchio and Salmon, 2007). L'interaction kinétochores-microtubules induit notamment le relargage de protéines du SAC comme Mad1, Mad2, Mps1, le complexe RZZ ou encore Spindly du kinétochore par l'action de moteurs protéiques, les dynéines (Basto et al., 2004; Gassmann et al., 2010; Hoffman et al., 2001; Howell et al., 2001; King, 2008; Musacchio and Salmon, 2007; Wojcik et al., 2001). p31^{comet} interagit avec Mad2 et favorise la rupture du MCC et l'ubiquitinylation de Cdc20 (Teichner et al., 2011; Varetta et al., 2011; Westhorpe et al., 2011). Sa réactivation en périphérie des kinétochores occupés par des microtubules peut également participer à son extraction et à l'inactivation du SAC. Cependant, les mécanismes activateurs de p31^{comet} à la périphérie des kinétochores attachés sont encore inconnus (Musacchio and Salmon, 2007; Westhorpe et al., 2011). L'extinction du SAC au niveau des kinétochores dépend également de l'action de PP1 (Pinsky et al., 2009; Vanoosthuyse and Hardwick, 2009). Le recrutement de PP1 au kinétochore dépend de KNL-1 où il est supposé qu'elle

déphosphoryle plusieurs substrats, notamment ceux de Mps1, pour inactiver le SAC (Foley and Kapoor, 2013). La rupture de l'interaction PP1–KNL-1 induit une incapacité à inactiver le SAC dans plusieurs organismes modèles (Espeut et al., 2012; Meadows et al., 2011; Rosenberg et al., 2011).

Nos résultats indiquent que le traitement par la S1P diminue la localisation kinétochorienne de Mad2 et de BubR1 (Figure 37) en présence de nocodazole. Cette observation peut expliquer pourquoi la surexpression de la voie SphKs/S1P induit une inactivation précoce du SAC en présence de chromosomes non alignés par le fuseau mitotique. La diminution de la localisation kinétochorienne de Mad2 et de BubR1 peut résulter d'un recrutement moindre de ces protéines ou alors de leur extraction plus efficace des kinétochores. Comme nous venons de le voir, la localisation kinétochorienne de ces protéines résulte de processus complexes régulés par de nombreux recruteurs et dépend également de leur extraction en réponse notamment à la capture du kinétochore par les microtubules. Dans nos conditions, nous avons traité les cellules par le nocodazole, un puissant désassembleur des microtubules. Il est donc peu probable que la diminution de la présence de Mad2 et de BubR1 au niveau des kinétochores résulte de leur extraction par les dynéines car leur effet dépend des microtubules.

Le traitement par la S1P peut altérer la localisation et/ou le fonctionnement des protéines impliqués dans le recrutement de Mad2 et de BubR1 comme Aurora B ou Mps1. Il est bien décrit que l'inhibition ou la déplétion de ces protéines bloque le recrutement des autres effecteurs du SAC et induisent une perte de l'activité du point de contrôle (Heinrich et al., 2012; Musacchio and Salmon, 2007; van der Waal et al., 2012; Vigneron et al., 2004; Yamagishi et al., 2010). De plus, la S1P peut altérer la formation, le recrutement et/ou la maintenance au kinétochore du complexe MCC comprenant à la fois Mad2 et BubR1. Le complexe MCC est notamment adressé au kinétochore par le recrutement de ses différents partenaires dépendant de la phosphorylation de KNL-1 et du complexe RZZ par Mps1 (London et al., 2012; Rischitor et al., 2007; Shepperd et al., 2012; Vanoosthuysse et al., 2004; Yamagishi et al., 2012). Il sera intéressant d'étudier si le traitement par la S1P altère le recrutement et l'activité d'Aurora B et de Mps1. En effet, l'altération de ces protéines peut expliquer pourquoi nous retrouvons une quantité moindre de Mad2 et de BubR1 au niveau des kinétochores en réponse à une stimulation par la S1P.

Il est également possible que l'extraction de Mad2 et de BubR1 résulte de l'activité de phosphatases comme PP1. Cependant, il n'est pas clair aujourd'hui si le recrutement de PP1 par KNL-1 dépend de la présence de microtubules au niveau du kinétochores. Les cibles de PP1 sont encore obscures mais il est supposé que PP1 déphosphoryle les substrats de Mps1 (Foley and Kapoor, 2013). Parmi ces substrats, la phosphorylation de KNL-1 par Mps1 est requise pour le recrutement de BubR1. Il est donc possible que la déphosphorylation de KNL-1 par PP1 si elle se produit participe au relargage de BubR1 du kinétochore.

La réduction de la localisation de Mad2 et de BubR1 au niveau des kinétochores en présence de S1P peut être extrapolée à une diminution de l'activité du SAC. Dans ce cas, les cellules traitées par

la S1P peuvent entrer en anaphase alors que tous leurs chromosomes ne sont pas correctement alignés, ce qui expliquerait le fort pourcentage d'erreurs d'alignement observés dans les cellules surexprimant les SphKs ou traitées par la S1P (Figure 35). Les cellules disposent d'un mécanisme de correction des attachements incorrects entre kinétochores et microtubules pour rectifier les anomalies d'alignement. Ce mécanisme repose supposément sur la tension établie au niveau des kinétochores par les microtubules du fuseau. Lors d'un attachement normal ou amphitélique, chaque pôle du fuseau capture par l'intermédiaire de ses microtubules un kinétochore d'un chromosome. Les forces exercées par le fuseau sont opposées générant ainsi une tension et étirant les kinétochores d'un même chromosome. Le modèle de correction des attachements proposé postule que cet étirement éloigne le complexe KMN de protéines comme Aurora B (Maresca and Salmon, 2009; Uchida et al., 2009) qui le phosphoryle pour déstabiliser les attachements kinétochores-microtubules (Foley and Kapoor, 2013; Musacchio and Salmon, 2007). Des attachements monotéliques ou syntéliques ne permettent pas l'établissement de tension kinétochorienne (Figure 6). Dans ces conditions, Aurora B peut phosphoryler ses substrats comme le complexe KMN et provoquer la rupture de ces attachements incorrects (Foley and Kapoor, 2013; Musacchio and Salmon, 2007). La résolution des attachements mérotéliques est plus complexe. Un attachement mérotélique est produit lorsque pour un chromosome donné, un kinétochore est relié aux deux pôles du fuseau par leurs microtubules kinétochoriens (Foley and Kapoor, 2013; Khodjakov and Pines, 2010; Musacchio and Salmon, 2007). Dans ce cas, l'intensité des forces de tension dépend du nombre de microtubules issus de chaque pôle interagissant avec le kinétochore. Chez les mammifères, on estime que chaque kinétochore interagit en moyenne avec une trentaine de microtubules. Ainsi, si au niveau d'un kinétochore capturé de façon mérotélique le nombre des microtubules impliqués dans l'attachement émanant d'un pôle diffère fortement de celui issu de l'autre pôle, la tension kinétochorienne établie sera modérée, rendant l'attachement sensible à la machinerie de correction. En revanche, si le nombre de microtubules impliqués de part et d'autre est comparable, une tension efficace sera générée, étirant le kinétochore et pouvant le rendre insensible au SAC ou du moins à la correction. La tolérance de ce type d'attachement induit la génération de chromosomes retardés et altère potentiellement la qualité de la ségrégation chromosomique (Holland and Cleveland, 2012; Musacchio and Salmon, 2007; Vitre and Cleveland, 2012).

3. Conséquences de la surexpression de la voie SphKs/S1P sur la stabilité du génome

La mitose est un processus fondamental permettant la multiplication cellulaire et la transmission fidèle du matériel génétique. De nombreux régulateurs de la mitose sont retrouvés fréquemment altérés dans le cancer (Carter et al., 2006; Kops et al., 2005; Perez de Castro et al., 2007). Cette dérégulation altère notamment la qualité de la ségrégation chromosomique entre les cellules filles, générant de l'aneuploïdie et de l'instabilité chromosomique, deux caractéristiques de la plupart des tumeurs humaines (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011). Ensemble, ces événements contribuent à

l'apparition du cancer ainsi qu'à la croissance tumorale et l'acquisition de propriétés agressives et de résistance à la mort induite par diverses sources de stress environnementaux ou à la thérapie (Gudimchuk et al., 2013; Potapova et al., 2013; Putkey et al., 2002; Weaver et al., 2003; Weaver et al., 2007).

Nos résultats démontrent que la surexpression de la voie SphKs/S1P altère la qualité de la ségrégation chromosomique (Figure 36). La conséquence peut être la génération de cellules aneuploïdes. Une trop forte altération du contenu en ADN des cellules n'est généralement pas viable. Les erreurs massives de ségrégation produites par l'inactivation complète du SAC ou le ciblage du fuseau mitotique induisent la mort cellulaire (Ganem et al., 2009; Kops et al., 2004; Michel et al., 2004a). Inversement, plusieurs études montrent que de faibles taux d'aneuploïdie et d'instabilité chromosomique peuvent favoriser l'initiation et la progression tumorale (Gudimchuk et al., 2013; Putkey et al., 2002; Weaver et al., 2003; Weaver et al., 2007) mais également constituer une source de variation génétique permettant l'adaptation de la tumeur aux différents stress son environnement et à la thérapie (Potapova et al., 2013). Il est donc important de déterminer si l'altération de la ségrégation chromosomique induite par la surexpression de la voie SphKs/S1P provoque ou non la mort des cellules aneuploïdes.

Dans de nombreuses tumeurs, l'apparition de cellules aneuploïdes est généralement associée à la perte du suppresseur de tumeur p53, un événement caractéristique de nombreux cancers qui apparaît relativement tôt dans l'initiation tumorale (Galipeau et al., 1996; Ramel et al., 1995; Soussi, 2007; Soussi and Wiman, 2007; Vogelstein et al., 2000; Weisz et al., 2007). Les souris *P53*^{-/-} développent très rapidement des tumeurs spontanées et notamment des lymphomes T connus pour être fréquemment aneuploïdes (Donehower et al., 1992; Jacks et al., 1994). Dans des cellules proficientes pour p53, la présence d'aneuploïde post-mitotique induit un arrêt de la prolifération dans la phase G1 suivante. En revanche, la perte de p53 confère à ces cellules la capacité à entrer de nouveau dans le cycle cellulaire (Borel et al., 2002; Casenghi et al., 1999; Cross et al., 1995; Khan and Wahl, 1998; Lanni and Jacks, 1998; Minn et al., 1996; Stewart et al., 1999). Il est intéressant de noter qu'en réponse à de nombreux stress génotoxiques, la protéine p53 est accumulée et induit la protéolyse de la SphK1 (Taha et al., 2004). Ceci a pour conséquences la diminution des taux de S1P et l'augmentation du céramide pour induire un arrêt de la prolifération cellulaire, l'apoptose ou la sénescence (Heffernan-Stroud et al., 2012; Heffernan-Stroud and Obeid, 2011). La mutation de p53 dans les tumeurs est accompagnée d'une augmentation de l'expression de la SphK1 (Samper et al., 2009). La voie SphKs/S1P étant impliquée dans la régulation de la survie et de la prolifération cellulaire, nous pouvons postuler que sa surexpression favorise la résistance à la mort et l'expansion de clones présentant un contenu génomique aneuploïde, et ce d'autant plus dans un contexte de déficience pour p53.

4. Surexpression de la voie SphKs/S1P et sensibilité à la chimiothérapie anti-mitotique

La voie SphKs/S1P est largement impliquée dans la transformation cellulaire, la progression tumorale, le processus métastatique et l'adaptation aux stress environnementaux comme l'hypoxie ou induits par des agents thérapeutiques (Ader et al., 2008; Bonhoure et al., 2008; Bonhoure et al., 2006; Brizuela et al., 2010; Cu villier et al., 2010; Dayon et al., 2009; Maceyka et al., 2012; Pchejetski et al., 2005; Ponnusamy et al., 2012; Xia et al., 2000). Il est aujourd'hui bien établi que la SphK1 est retrouvée surexprimée dans un large spectre de tumeurs humaines comme le cancer du sein, de la prostate, du rein, du côlon, du poumon, de l'estomac, de l'utérus, de l'ovaire, dans le glioblastome, ou encore dans la leucémie aigüe myéloïde (Cu villier et al., 2010; French et al., 2003; Johnson et al., 2005; Kawamori et al., 2006; Kohno et al., 2006; Li et al., 2009; Ruckhaberle et al., 2008; Song et al., 2011). Dans plusieurs de ces études, l'augmentation de l'expression de la SphK1 corrèle avec un grade tumoral plus important et, surtout, avec une survie des patients réduite (Kawamori et al., 2006; Li et al., 2008; Li et al., 2009; Malavaud et al., 2010; Ruckhaberle et al., 2008; Van Brocklyn et al., 2005). De plus, le niveau d'expression de la SphK1 est corrélé à l'efficacité de la réponse thérapeutique ainsi qu'à l'apparition de résistance à divers agents de chimiothérapie ou à la radiothérapie dans de nombreux cancers (Akao et al., 2006; Baran et al., 2007; Bonhoure et al., 2008; Bonhoure et al., 2006; Brizuela et al., 2010; Dayon et al., 2009; Guillermet-Guibert et al., 2009; Malavaud et al., 2010; Pchejetski et al., 2008; Pchejetski et al., 2005; Sobue et al., 2008).

En chimiothérapie, certains agents agissent spécifiquement au cours de la mitose pour tuer les cellules prolifératives : il s'agit des poisons du fuseau (Jordan and Wilson, 2004). Ces composés ciblent les microtubules et bloquent leur dynamique. Parmi eux, le paclitaxel, ou taxol, de la famille des taxanes, stabilise l'extrémité « + » des microtubules, empêchant leur dépolymérisation. Le paclitaxel provoque notamment la baisse de la tension kinétochorienne soutenant ainsi l'activation du SAC (Jordan and Wilson, 2004; Musacchio and Salmon, 2007). De plus, le blocage de la dynamique des microtubules altère le processus de correction des attachements incorrects ainsi que la progression en anaphase. Cependant, il est décrit qu'au cours d'une longue incubation avec du paclitaxel, les cellules sont capables d'échapper à l'arrêt en mitose par le SAC entraînant très généralement la formation de cellules généralement aneuploïdes (Brito and Rieder, 2006b; Marzo and Naval, 2013).

Nous avons évalué la capacité des cellules à s'arrêter en mitose par un traitement par les poisons du fuseau mitotique (Figure 38). Nos résultats indiquent qu'en présence de nocodazole ou de taxol, l'index mitotique de populations traitées par la S1P diminue significativement par rapport à celui des contrôles. Au vu de nos données sur le SAC, il est possible que cette diminution résulte d'une incapacité des cellules à maintenir l'activité du point de contrôle provoquant ainsi une sortie prématurée de mitose. Partant de cette hypothèse, ceci suggère que le traitement par la S1P diminue la sensibilité des cellules à ces poisons du fuseau. Il ne faut pas non plus négliger l'hypothèse d'une

mortalité plus importante en mitose du fait du double traitement taxol/S1P. Cependant, notre équipe a établi que la SphK1 est impliquée dans l'acquisition de résistance au docétaxel, un analogue du paclitaxel utilisé pour le traitement clinique du cancer de la prostate (Akao et al., 2006; Pchejetski et al., 2008; Pchejetski et al., 2005), suggérant ainsi que la voie SphKs/S1P puisse participer à cette résistance en diminuant la sensibilité des cellules en mitose. Ces hypothèses sont à approfondir. Dans un premier temps, une expérience simple serait de suivre par vidéomicroscopie des cellules traitées par le paclitaxel en présence ou non de S1P. Ceci permettrait de déterminer si le double traitement paclitaxel/S1P induit une augmentation ou non de la mort en mitose mais également si les cellules traitées par la S1P sortent de mitose plus rapidement que les cellules contrôles et de suivre leur devenir : vont-elles mourir ou continuer à proliférer ?

Il est intéressant d'étudier si la S1P protège de la mort induite par les poisons du fuseau car ceci pourrait constituer une explication moléculaire à la contribution de la voie SphKs/S1P à la résistance notamment au docétaxel (Akao et al., 2006; Pchejetski et al., 2008; Pchejetski et al., 2005). Il est également décrit que l'inhibition de la SphK1 permet de sensibiliser les cellules à l'apoptose induite par le docétaxel (Akao et al., 2006; Pchejetski et al., 2008; Pchejetski et al., 2005; Sauer et al., 2009; Song et al., 2011). Cependant, Il apparaît aujourd'hui plus intéressant de cibler la S1P que les SphKs. Les inhibiteurs pharmacologiques de la SphK1 n'ont pour le moment pas été réellement concluants en clinique. Par contre, l'émergence de nouveaux outils innovants, des anticorps neutralisant la S1P, le Sphingomab™ et sa version humanisée le sonopiczumab (ASONEP™), suscite un grand intérêt. Ces anticorps n'agissent que sur la signalisation extracellulaire de la S1P ; ses fonctions intracellulaires restent donc in affectées. Le sonopiczumab a subi des essais cliniques de phase I et II respectivement pour le traitement des tumeurs solides et des carcinomes rénaux (Lpath Inc.). De plus, des données en cours de publication dans notre équipe indiquent un rôle novateur dans le processus de normalisation vasculaire. Il serait donc intéressant de déterminer si la neutralisation de la S1P par ces outils innovants permet de sensibiliser les cellules à la mort induite par les agents chimiothérapeutiques anti-mitotiques.

L'ensemble de nos travaux constitue la première étude décrivant le rôle de la voie SphKs/S1P dans le contrôle de la mitose. Nous montrons que sa surexpression, fréquemment retrouvée dans le cancer, entraîne des défauts de la progression mitotique et de la ségrégation chromosomique, pouvant conduire à de l'aneuploïdie. De plus, nos données préliminaires peuvent suggérer que la surexpression de la voie SphKs/S1P réduise la sensibilité des cellules aux poisons du fuseau mitotique comme le paclitaxel utilisé en chimiothérapie antitumorale. Ces travaux sont de nature à mieux comprendre comment la voie SphKs/S1P participe au développement tumoral et renforcent son intérêt comme cible thérapeutique dans le traitement du cancer.

Références bibliographiques

Abrieu, A., Kahana, J.A., Wood, K.W., and Cleveland, D.W. (2000). CENP-E as an essential component of the mitotic checkpoint in vitro. *Cell* 102, 817-826.

Abrieu, A., Magnaghi-Jaulin, L., Kahana, J.A., Peter, M., Castro, A., Vigneron, S., Lorca, T., Cleveland, D.W., and Labbe, J.C. (2001). Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell* 106, 83-93.

Ader, I., Brizuela, L., Bouquerel, P., Malavaud, B., and Cuvillier, O. (2008). Sphingosine kinase 1: a new modulator of hypoxia inducible factor 1alpha during hypoxia in human cancer cells. *Cancer Res* 68, 8635-8642.

Ahmad, M., Long, J.S., Pyne, N.J., 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.

Akao, Y., Banno, Y., Nakagawa, Y., Hasegawa, N., Kim, T.J., Murate, T., Igarashi, Y., and Nozawa, Y. (2006). High expression of sphingosine kinase 1 and S1P receptors in chemotherapy-resistant prostate cancer PC3 cells and their camptothecin-induced up-regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 342, 1284-1290.

Akhmanova, A., and Steinmetz, M.O. (2010). Microtubule +TIPs at a glance. *J Cell Sci* 123, 3415-3419.

Akiyoshi, B., Sarangapani, K.K., Powers, A.F., Nelson, C.R., Reichow, S.L., Arellano-Santoyo, H., Gonen, T., Ranish, J.A., Asbury, C.L., and Biggins, S. (2010). Tension directly stabilizes reconstituted kinetochore-microtubule attachments. *Nature* 468, 576-579.

Alderton, F., Rakhit, S., Kong, K.C., Palmer, T., Sambhi, B., Pyne, S., and Pyne, N.J. (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.

Aleman, R., van Koppen, C.J., Danneberg, K., Ter Braak, M., and Meyer Zu Heringdorf, D. (2007). Regulation and functional roles of sphingosine kinases. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 374, 413-428.

Allende, M.L., Dreier, J.L., Mandala, S., and Proia, R.L. (2004). Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. *J Biol Chem* 279, 15396-15401.

Allende, M.L., Tuymetova, G., Lee, B.G., Bonifacino, E., Wu, Y.P., and Proia, R.L. (2010). S1P1 receptor directs the release of immature B cells from bone marrow into blood. *J Exp Med* 207, 1113-1124.

Allende, M.L., Yamashita, T., and Proia, R.L. (2003). G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood* 102, 3665-3667.

Alushin, G.M., Ramey, V.H., Pasqualato, S., Ball, D.A., Grigorieff, N., Musacchio, A., and Nogales, E. (2010). The Ndc80 kinetochore complex forms oligomeric arrays along microtubules. *Nature* 467, 805-810.

Alvarez, S.E., Harikumar, K.B., Hait, N.C., Allegood, J., Strub, G.M., Kim, E.Y., Maceyka, M., Jiang, H., Luo, C., Kordula, T., *et al.* (2010). Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature* 465, 1084-1088.

- An, S., Zheng, Y., and Bleu, T. (2000). Sphingosine 1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5. *J Biol Chem* 275, 288-296.
- Ancellin, N., and Hla, T. (1999). Differential pharmacological properties and signal transduction of the sphingosine 1-phosphate receptors EDG-1, EDG-3, and EDG-5. *J Biol Chem* 274, 18997-19002.
- Anelli, V., Gault, C.R., Cheng, A.B., and Obeid, L.M. (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, C.R., Snider, A.J., and Obeid, L.M. (2010). Role of sphingosine kinase-1 in paracrine/transcellular angiogenesis and lymphangiogenesis in vitro. *Faseb J* 24, 2727-2738.
- Antoon, J.W., Meacham, W.D., Bratton, M.R., Slaughter, E.M., Rhodes, L.V., Ashe, H.B., Wiese, T.E., Burow, M.E., and Beckman, B.S. (2011). Pharmacological inhibition of sphingosine kinase isoforms alters estrogen receptor signaling in human breast cancer. *J Mol Endocrinol* 46, 205-216.
- Antoon, J.W., White, M.D., Driver, J.L., Burow, M.E., and Beckman, B.S. (2012). Sphingosine kinase isoforms as a therapeutic target in endocrine therapy resistant luminal and basal-A breast cancer. *Experimental biology and medicine* 237, 832-844.
- Aressy, B., and Ducommun, B. (2008). Cell cycle control by the CDC25 phosphatases. *Anticancer Agents Med Chem* 8, 818-824.
- Arikawa, K., Takuwa, N., Yamaguchi, H., Sugimoto, N., Kitayama, J., Nagawa, H., Takehara, K., and Takuwa, Y. (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.
- Azuma, H., Horie, S., Muto, S., Otsuki, Y., Matsumoto, K., Morimoto, J., Gotoh, R., Okuyama, A., Suzuki, S., Katsuoka, Y., *et al.* (2003a). Selective cancer cell apoptosis induced by FTY720; evidence for a Bcl-dependent pathway and impairment in ERK activity. *Anticancer research* 23, 3183-3193.
- Azuma, H., Takahara, S., Horie, S., Muto, S., Otsuki, Y., and Katsuoka, Y. (2003b). Induction of apoptosis in human bladder cancer cells in vitro and in vivo caused by FTY720 treatment. *The Journal of urology* 169, 2372-2377.
- Azuma, H., Takahara, S., Ichimaru, N., Wang, J.D., Itoh, Y., Otsuki, Y., Morimoto, J., Fukui, R., Hoshiga, M., Ishihara, T., *et al.* (2002). Marked prevention of tumor growth and metastasis by a novel immunosuppressive agent, FTY720, in mouse breast cancer models. *Cancer Res* 62, 1410-1419.
- Babu, J.R., Jeganathan, K.B., Baker, D.J., Wu, X., Kang-Decker, N., and van Deursen, J.M. (2003). Rae1 is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation. *J Cell Biol* 160, 341-353.
- Baker, D.J., Jeganathan, K.B., Cameron, J.D., Thompson, M., Juneja, S., Kopecka, A., Kumar, R., Jenkins, R.B., de Groen, P.C., Roche, P., *et al.* (2004). BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nature genetics* 36, 744-749.
- Bandhuvula, P., Tam, Y.Y., Oskouian, B., and Saba, J.D. (2005). The immune modulator FTY720 inhibits sphingosine-1-phosphate lyase activity. *J Biol Chem* 280, 33697-33700.
- Baran, Y., Salas, A., Senkal, C.E., Gunduz, U., Bielawski, J., Obeid, L.M., and Ogretmen, B. (2007). Alterations of ceramide/sphingosine 1-phosphate rheostat involved in the regulation of resistance to imatinib-induced apoptosis in K562 human chronic myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* 282, 10922-10934.

- Barr, R.K., Lynn, H.E., Moretti, P.A., Khew-Goodall, Y., and Pitson, S.M. (2008). Deactivation of sphingosine kinase 1 by protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 283, 34994-35002.
- Bartek, J., Bartkova, J., and Lukas, J. (1996). The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Current opinion in cell biology* 8, 805-814.
- Barth, B.M., Shanmugavelandy, S.S., Kaiser, J.M., McGovern, C., Altinoglu, E.I., Haakenson, J.K., Hengst, J.A., Gilius, E.L., Knupp, S.A., Fox, T.E., *et al.* (2013). PhotolmmunoNanoTherapy reveals an anticancer role for sphingosine kinase 2 and dihydrosphingosine-1-phosphate. *ACS Nano* 7, 2132-2144.
- Basto, R., Scaerou, F., Mische, S., Wojcik, E., Lefebvre, C., Gomes, R., Hays, T., and Karess, R. (2004). In vivo dynamics of the rough deal checkpoint protein during *Drosophila* mitosis. *Curr Biol* 14, 56-61.
- Baudhuin, L.M., Jiang, Y., Zaslavsky, A., Ishii, I., Chun, J., and Xu, Y. (2004). S1P3-mediated Akt activation and cross-talk with platelet-derived growth factor receptor (PDGFR). *Faseb J* 18, 341-343.
- Bayerl, M.G., Bruggeman, R.D., Conroy, E.J., Hengst, J.A., King, T.S., Jimenez, M., Claxton, D.F., and Yun, J.K. (2008). Sphingosine kinase 1 protein and mRNA are overexpressed in non-Hodgkin lymphomas and are attractive targets for novel pharmacological interventions. *Leukemia & lymphoma* 49, 948-954.
- Beljanski, V., Knaak, C., and Smith, C.D. (2010). A novel sphingosine kinase inhibitor induces autophagy in tumor cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 333, 454-464.
- Beljanski, V., Knaak, C., Zhuang, Y., and Smith, C.D. (2011a). Combined anticancer effects of sphingosine kinase inhibitors and sorafenib. *Investigational new drugs* 29, 1132-1142.
- Beljanski, V., Lewis, C.S., and Smith, C.D. (2011b). Antitumor activity of sphingosine kinase 2 inhibitor ABC294640 and sorafenib in hepatocellular carcinoma xenografts. *Cancer Biol Ther* 11, 524-534.
- Besson, A., Dowdy, S.F., and Roberts, J.M. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* 14, 159-169.
- Billich, A., Bornancin, F., Devay, P., Mechtcheriakova, D., Urtz, N., and Baumruker, T. (2003). Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases. *J Biol Chem* 278, 47408-47415.
- Billich, A., Bornancin, F., Mechtcheriakova, D., Natt, F., Huesken, D., and Baumruker, T. (2005). Basal and induced sphingosine kinase 1 activity in A549 carcinoma cells: function in cell survival and IL-1beta and TNF-alpha induced production of inflammatory mediators. *Cell Signal* 17, 1203-1217.
- Birchwood, C.J., Saba, J.D., Dickson, R.C., and Cunningham, K.W. (2001). Calcium influx and signaling in yeast stimulated by intracellular sphingosine 1-phosphate accumulation. *J Biol Chem* 276, 11712-11718.
- Blagosklonny, M.V., and Pardee, A.B. (2002). The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle* 1, 103-110.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., and Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349-352.
- Bonhoure, E., Lauret, A., Barnes, D.J., Martin, C., Malavaud, B., Kohama, T., Melo, J.V., and Cu villier, O. (2008). Sphingosine kinase-1 is a downstream regulator of imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia* 22, 971-979.

- Bonhoure, E., Pchejetski, D., Aouali, N., Morjani, H., Levade, T., Kohama, T., and Cuvillier, O. (2006). Overcoming MDR-associated chemoresistance in HL-60 acute myeloid leukemia cells by targeting sphingosine kinase-1. *Leukemia* 20, 95-102.
- Borel, F., Lohez, O.D., Lacroix, F.B., and Margolis, R.L. (2002). Multiple centrosomes arise from tetraploidy checkpoint failure and mitotic centrosome clusters in p53 and RB pocket protein-compromised cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9819-9824.
- Boveri, T. (1902). Über mehrpolige Mitosen als Mittel zur Analyse des Zellkerns. *Verhandlungen der physikalisch-medizinischen Gessellschaft zu Würzburg. Neu Folge* 35, 67-90.
- Boveri, T. (1914). Zur Frage der Entstehung Maligner Tumoren.
- Bringmann, H., and Hyman, A.A. (2005). A cytokinesis furrow is positioned by two consecutive signals. *Nature* 436, 731-734.
- Brinkmann, V. (2007). Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol Ther* 115, 84-105.
- Brinkmann, V., Billich, A., Baumruker, T., Heining, P., Schmouder, R., Francis, G., Aradhye, S., and Burtin, P. (2010). Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 883-897.
- Brinkmann, V., Davis, M.D., Heise, C.E., Albert, R., Cottens, S., Hof, R., Bruns, C., Prieschl, E., Baumruker, T., Hiestand, P., *et al.* (2002). The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem* 277, 21453-21457.
- Brito, D.A., and Rieder, C.L. (2006a). Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr Biol* 16, 1194-1200.
- Brito, D.A., and Rieder, C.L. (2006b). Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr Biol* 16, 1194-1200.
- Brizuela, L., Ader, I., Mazerolles, C., Bocquet, M., Malavaud, B., and Cuvillier, O. (2012). First evidence of sphingosine 1-phosphate lyase protein expression and activity downregulation in human neoplasm: implication for resistance to therapeutics in prostate cancer. *Mol Cancer Ther* 11, 1841-1851.
- Brizuela, L., Dayon, A., Doumerc, N., Ader, I., Golzio, M., Izard, J.C., Hara, Y., Malavaud, B., and Cuvillier, O. (2010). The sphingosine kinase-1 survival pathway is a molecular target for the tumor-suppressive tea and wine polyphenols in prostate cancer. *FASEB journal* 24, 3882-3894.
- Buehrer, B.M., and Bell, R.M. (1992). Inhibition of sphingosine kinase in vitro and in platelets. Implications for signal transduction pathways. *J Biol Chem* 267, 3154-3159.
- Carmena, M., and Earnshaw, W.C. (2003). The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 842-854.
- Carter, S.L., Eklund, A.C., Kohane, I.S., Harris, L.N., and Szallasi, Z. (2006). A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nature genetics* 38, 1043-1048.
- Casenghi, M., Mangiacasale, R., Tuynder, M., Caillet-Fauquet, P., Elhajouji, A., Lavia, P., Mousset, S., Kirsch-Volders, M., and Cundari, E. (1999). p53-independent apoptosis and p53-dependent block of DNA rereplication following mitotic spindle inhibition in human cells. *Exp Cell Res* 250, 339-350.

- 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, Y.W., Jeyaprakash, A.A., Nigg, E.A., and Santamaria, A. (2012). Aurora B controls kinetochore-microtubule attachments by inhibiting Ska complex-KMN network interaction. *J Cell Biol* 196, 563-571.
- 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. *American journal of physiology Cell physiology* 297, C451-458.
- Chao, W.C., Kulkarni, K., Zhang, Z., Kong, E.H., and Barford, D. (2012). Structure of the mitotic checkpoint complex. *Nature* 484, 208-213.
- Cheeseman, I.M., Chappie, J.S., Wilson-Kubalek, E.M., and Desai, A. (2006). The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell* 127, 983-997.
- Chen, N., and Karantza-Wadsworth, V. (2009). Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1793, 1516-1523.
- Chiba, K., Yanagawa, Y., Masubuchi, Y., Kataoka, H., Kawaguchi, T., Ohtsuki, M., and Hoshino, Y. (1998). FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing. *J Immunol* 160, 5037-5044.
- Chipuk, J.E., McStay, G.P., Bharti, A., Kuwana, T., Clarke, C.J., Siskind, L.J., Obeid, L.M., and Green, D.R. (2012). Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. *Cell* 148, 988-1000.
- Choi, C.M., Seo, K.W., Jang, S.J., Oh, Y.M., Shim, T.S., Kim, W.S., Lee, D.S., and Lee, S.D. (2009). Chromosomal instability is a risk factor for poor prognosis of adenocarcinoma of the lung: Fluorescence in situ hybridization analysis of paraffin-embedded tissue from Korean patients. *Lung Cancer* 64, 66-70.
- Christoffersen, C., Obinata, H., Kumaraswamy, S.B., Galvani, S., Ahnstrom, J., Sevvana, M., Egerer-Sieber, C., Muller, Y.A., Hla, T., Nielsen, L.B., *et al.* (2011). Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 9613-9618.
- Chumanevich, A.A., Poudyal, D., Cui, X., Davis, T., Wood, P.A., Smith, C.D., and Hofseth, L.J. (2010). Suppression of colitis-driven colon cancer in mice by a novel small molecule inhibitor of sphingosine kinase. *Carcinogenesis* 31, 1787-1793.
- Chun, J., Hla, T., Lynch, K.R., Spiegel, S., and Moolenaar, W.H. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 62, 579-587.
- Cleveland, D.W., Mao, Y., and Sullivan, K.F. (2003). Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* 112, 407-421.
- Colombo, R., Caldarelli, M., Mennecozzi, M., Giorgini, M.L., Sola, F., Cappella, P., Perrera, C., Depaolini, S.R., Rusconi, L., Cucchi, U., *et al.* (2010). Targeting the mitotic checkpoint for cancer therapy with NMS-P715, an inhibitor of MPS1 kinase. *Cancer Res* 70, 10255-10264.
- Connell-Crowley, L., Solomon, M.J., Wei, N., and Harper, J.W. (1993). Phosphorylation independent activation of human cyclin-dependent kinase 2 by cyclin A in vitro. *Mol Biol Cell* 4, 79-92.

- Cross, S.M., Sanchez, C.A., Morgan, C.A., Schimke, M.K., Ramel, S., Idzerda, R.L., Raskind, W.H., and Reid, B.J. (1995). A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* 267, 1353-1356.
- Cuvillier, O. (2002). Sphingosine in apoptosis signaling. *Biochim Biophys Acta* 1585, 153-162.
- Cuvillier, O. (2007). Sphingosine kinase-1--a potential therapeutic target in cancer. *Anticancer Drugs* 18, 105-110.
- Cuvillier, O., Ader, I., Bouquerel, P., Brizuela, L., Malavaud, B., Mazerolles, C., and Rischmann, P. (2010). Activation of sphingosine kinase-1 in cancer: implications for therapeutic targeting. *Curr Mol Pharmacol* 3, 53-65.
- Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P.G., Coso, O.A., Gutkind, S., and Spiegel, S. (1996). Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381, 800-803.
- D'Angiolella, V., Mari, C., Nocera, D., Rametti, L., and Grieco, D. (2003). The spindle checkpoint requires cyclin-dependent kinase activity. *Genes & development* 17, 2520-2525.
- Dai, W., Wang, Q., Liu, T., Swamy, M., Fang, Y., Xie, S., Mahmood, R., Yang, Y.M., Xu, M., and Rao, C.V. (2004). Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency. *Cancer Res* 64, 440-445.
- Daum, G., Grabski, A., and Reidy, M.A. (2009). Sphingosine 1-phosphate: a regulator of arterial lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29, 1439-1443.
- Davenport, J., Harris, L.D., and Goorha, R. (2006). Spindle checkpoint function requires Mad2-dependent Cdc20 binding to the Mad3 homology domain of BubR1. *Exp Cell Res* 312, 1831-1842.
- Davis, M.D., Clemens, J.J., Macdonald, T.L., and Lynch, K.R. (2005a). Sphingosine 1-phosphate analogs as receptor antagonists. *J Biol Chem* 280, 9833-9841.
- Davis, M.D., Clemens, J.J., Macdonald, T.L., and Lynch, K.R. (2005b). Sphingosine 1-phosphate analogs as receptor antagonists. *J Biol Chem* 280, 9833-9841.
- Dayon, A., Brizuela, L., Martin, C., Mazerolles, C., Pirot, N., Doumerc, N., Nogueira, L., Golzio, M., Teissie, J., Serre, G., *et al.* (2009). Sphingosine kinase-1 is central to androgen-regulated prostate cancer growth and survival. *PLoS One* 4, e8048.
- Deevska, G.M., and Nikolova-Karakashian, M.N. (2011). The twists and turns of sphingolipid pathway in glucose regulation. *Biochimie* 93, 32-38.
- Delcourt, N., Bockaert, J., and Marin, P. (2007). GPCR-jacking: from a new route in RTK signalling to a new concept in GPCR activation. *Trends in pharmacological sciences* 28, 602-607.
- Delon, C., Manifava, M., Wood, E., Thompson, D., Krugmann, S., Pyne, S., and Ktistakis, N.T. (2004). Sphingosine kinase 1 is an intracellular effector of phosphatidic acid. *J Biol Chem* 279, 44763-44774.
- Dickson, M.A., Carvajal, R.D., Merrill, A.H., Jr., Gonen, M., Cane, L.M., and Schwartz, G.K. (2011). A phase I clinical trial of safingol in combination with cisplatin in advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 17, 2484-2492.
- Dobles, M., Liberal, V., Scott, M.L., Benezra, R., and Sorger, P.K. (2000). Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. *Cell* 101, 635-645.

Doll, 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. *Endocrine-related cancer* 14, 325-335.

Don, A.S., and Rosen, H. (2009). A lipid binding domain in sphingosine kinase 2. *Biochem Biophys Res Commun* 380, 87-92.

Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-221.

Doxsey, S., Zimmerman, W., and Mikule, K. (2005). Centrosome control of the cell cycle. *Trends Cell Biol* 15, 303-311.

Du, W., Takuwa, N., Yoshioka, K., Okamoto, Y., Gonda, K., Sugihara, K., Fukamizu, A., Asano, M., and Takuwa, Y. (2010). S1P(2), the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, negatively regulates tumor angiogenesis and tumor growth in vivo in mice. *Cancer Res* 70, 772-781.

Dumontet, C., and Jordan, M.A. (2010). Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nature reviews Drug discovery* 9, 790-803.

Edsall, L.C., Pirianov, G.G., and Spiegel, S. (1997). Involvement of sphingosine 1-phosphate in nerve growth factor-mediated neuronal survival and differentiation. *J Neurosci* 17, 6952-6960.

El-Shewy, H.M., Johnson, K.R., Lee, M.H., Jaffa, A.A., Obeid, L.M., and Luttrell, L.M. (2006). Insulin-like growth factors mediate heterotrimeric G protein-dependent ERK1/2 activation by transactivating sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem* 281, 31399-31407.

Elliott, M.R., Chekeni, F.B., Trampont, P.C., Lazarowski, E.R., Kadl, A., Walk, S.F., Park, D., Woodson, R.I., Ostankovich, M., Sharma, P., *et al.* (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461, 282-286.

Endo, K., Igarashi, Y., Nisar, M., Zhou, Q.H., and Hakomori, S. (1991). Cell membrane signaling as target in cancer therapy: inhibitory effect of N,N-dimethyl and N,N,N-trimethyl sphingosine derivatives on in vitro and in vivo growth of human tumor cells in nude mice. *Cancer Res* 51, 1613-1618.

English, D., Welch, Z., Kovala, A.T., Harvey, K., Volpert, O.V., Brindley, D.N., and Garcia, J.G. (2000). Sphingosine 1-phosphate released from platelets during clotting accounts for the potent endothelial cell chemotactic activity of blood serum and provides a novel link between hemostasis and angiogenesis. *Faseb J* 14, 2255-2265.

Espeut, J., Cheerambathur, D.K., Krenning, L., Oegema, K., and Desai, A. (2012). Microtubule binding by KNL-1 contributes to spindle checkpoint silencing at the kinetochore. *J Cell Biol* 196, 469-482.

Ettinger, A.W., Wilsch-Brauninger, M., Marzesco, A.M., Bickle, M., Lohmann, A., Maliga, Z., Karbanova, J., Corbeil, D., Hyman, A.A., and Huttner, W.B. (2011). Proliferating versus differentiating stem and cancer cells exhibit distinct midbody-release behaviour. *Nature communications* 2, 503.

Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389-396.

Eves, E.M., Shapiro, P., Naik, K., Klein, U.R., Trakul, N., and Rosner, M.R. (2006). Raf kinase inhibitory protein regulates aurora B kinase and the spindle checkpoint. *Molecular cell* 23, 561-574.

Fisher, K.E., Pop, A., Koh, W., Anthis, N.J., Saunders, W.B., and Davis, G.E. (2006). Tumor cell invasion of collagen matrices requires coordinate lipid agonist-induced G-protein and membrane-type matrix metalloproteinase-1-dependent signaling. *Molecular cancer* 5, 69.

- Fitzpatrick, L.R., Green, C., Frauenhoffer, E.E., French, K.J., Zhuang, Y., Maines, L.W., Upson, J.J., Paul, E., Donahue, H., Mosher, T.J., *et al.* (2011). Attenuation of arthritis in rodents by a novel orally-available inhibitor of sphingosine kinase. *Inflammopharmacology* 19, 75-87.
- Flemming, W. (1882). *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung* (Leipzig, F. C. W. Vogel).
- Foley, E.A., and Kapoor, T.M. (2013). Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 25-37.
- Foley, E.A., Maldonado, M., and Kapoor, T.M. (2011). Formation of stable attachments between kinetochores and microtubules depends on the B56-PP2A phosphatase. *Nat Cell Biol* 13, 1265-1271.
- Foster, C.A., Howard, L.M., Schweitzer, A., Persohn, E., Hiestand, P.C., Balatoni, B., Reuschel, R., Beerli, C., Schwartz, M., and Billich, A. (2007). Brain penetration of the oral immunomodulatory drug FTY720 and its phosphorylation in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis: consequences for mode of action in multiple sclerosis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 323, 469-475.
- Foster, S.A., and Morgan, D.O. (2012). The APC/C subunit Mnd2/Apc15 promotes Cdc20 autoubiquitination and spindle assembly checkpoint inactivation. *Molecular cell* 47, 921-932.
- Fox, T.E., Bewley, M.C., Unrath, K.A., Pedersen, M.M., Anderson, R.E., Jung, D.Y., Jefferson, L.S., Kim, J.K., Bronson, S.K., Flanagan, J.M., *et al.* (2011). Circulating sphingolipid biomarkers in models of type 1 diabetes. *J Lipid Res* 52, 509-517.
- French, K.J., Schrecengost, R.S., Lee, B.D., Zhuang, Y., Smith, S.N., Eberly, J.L., Yun, J.K., and Smith, C.D. (2003). Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Res* 63, 5962-5969.
- French, K.J., Upson, J.J., Keller, S.N., Zhuang, Y., Yun, J.K., and Smith, C.D. (2006). Antitumor activity of sphingosine kinase inhibitors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 318, 596-603.
- French, K.J., Zhuang, Y., Maines, L.W., Gao, P., Wang, W., Beljanski, V., Upson, J.J., Green, C.L., Keller, S.N., and Smith, C.D. (2010). Pharmacology and antitumor activity of ABC294640, a selective inhibitor of sphingosine kinase-2. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 333, 129-139.
- Galan-Malo, P., Vela, L., Gonzalo, O., Calvo-Sanjuan, R., Gracia-Fleta, L., Naval, J., and Marzo, I. (2012). Cell fate after mitotic arrest in different tumor cells is determined by the balance between slippage and apoptotic threshold. *Toxicology and applied pharmacology* 258, 384-393.
- Galipeau, P.C., Cowan, D.S., Sanchez, C.A., Barrett, M.T., Emond, M.J., Levine, D.S., Rabinovitch, P.S., and Reid, B.J. (1996). 17p (p53) allelic losses, 4N (G2/tetraploid) populations, and progression to aneuploidy in Barrett's esophagus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7081-7084.
- Ganem, N.J., Godinho, S.A., and Pellman, D. (2009). A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* 460, 278-282.
- Gao, P., and Smith, C.D. (2011). Ablation of sphingosine kinase-2 inhibits tumor cell proliferation and migration. *Mol Cancer Res* 9, 1509-1519.
- Gao, Y.F., Li, T., Chang, Y., Wang, Y.B., Zhang, W.N., Li, W.H., He, K., Mu, R., Zhen, C., Man, J.H., *et al.* (2011). Cdk1-phosphorylated CUEDC2 promotes spindle checkpoint inactivation and chromosomal instability. *Nat Cell Biol* 13, 924-933.

- Garcia, Z., Silio, V., Marques, M., Cortes, I., Kumar, A., Hernandez, C., Checa, A.I., Serrano, A., and Carrera, A.C. (2006). A PI3K activity-independent function of p85 regulatory subunit in control of mammalian cytokinesis. *The EMBO journal* 25, 4740-4751.
- Gassmann, R., Holland, A.J., Varma, D., Wan, X., Civril, F., Cleveland, D.W., Oegema, K., Salmon, E.D., and Desai, A. (2010). Removal of Spindly from microtubule-attached kinetochores controls spindle checkpoint silencing in human cells. *Genes & development* 24, 957-971.
- Gatlin, J.C., and Bloom, K. (2010). Microtubule motors in eukaryotic spindle assembly and maintenance. *Seminars in cell & developmental biology* 21, 248-254.
- Gault, C.R., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (2010). An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp Med Biol* 688, 1-23.
- Gestaut, D.R., Graczyk, B., Cooper, J., Widlund, P.O., Zelter, A., Wordeman, L., Asbury, C.L., and Davis, T.N. (2008). Phosphoregulation and depolymerization-driven movement of the Dam1 complex do not require ring formation. *Nat Cell Biol* 10, 407-414.
- Gey GO, C.W.K.M. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* 12, 264-265.
- Gharbi-Ayachi, A., Labbe, J.C., Burgess, A., Vigneron, S., Strub, J.M., Brioude, E., Van-Dorssele, A., Castro, A., and Lorca, T. (2010). The substrate of Greatwall kinase, Arpp19, controls mitosis by inhibiting protein phosphatase 2A. *Science* 330, 1673-1677.
- Gillies, L., Lee, S.C., Long, J.S., Ktistakis, N., Pyne, N.J., and Pyne, S. (2009). The sphingosine 1-phosphate receptor 5 and sphingosine kinases 1 and 2 are localised in centrosomes: possible role in regulating cell division. *Cell Signal* 21, 675-684.
- Glickman, M., Malek, R.L., Kwitek-Black, A.E., Jacob, H.J., and Lee, N.H. (1999). Molecular cloning, tissue-specific expression, and chromosomal localization of a novel nerve growth factor-regulated G-protein-coupled receptor, nrg-1. *Molecular and cellular neurosciences* 14, 141-152.
- Gomez-Brouchet, A., Pchejetski, D., Brizuela, L., Garcia, V., Altie, M.F., Maddelein, M.L., Delisle, M.B., and Cuvillier, O. (2007). Critical role for sphingosine kinase-1 in regulating survival of neuroblastoma cells exposed to amyloid-beta peptide. *Mol Pharmacol* 72, 341-349.
- Gonda, K., Okamoto, H., Takuwa, N., Yatomi, Y., Okazaki, H., Sakurai, T., Kimura, S., Sillard, R., Harii, K., and Takuwa, Y. (1999). The novel sphingosine 1-phosphate receptor AGR16 is coupled via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins to multiple signalling pathways. *Biochem J* 337 (Pt 1), 67-75.
- Graler, M.H., Bernhardt, G., and Lipp, M. (1998). EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue. *Genomics* 53, 164-169.
- Graler, M.H., and Goetzl, E.J. (2004). The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors. *Faseb J* 18, 551-553.
- Guadagno, T.M., and Ferrell, J.E., Jr. (1998). Requirement for MAPK activation for normal mitotic progression in *Xenopus* egg extracts. *Science* 282, 1312-1315.
- Gudimchuk, N., Vitre, B., Kim, Y., Kiyatkin, A., Cleveland, D.W., Ataulakhanov, F.I., and Grishchuk, E.L. (2013). Kinetochore kinesin CENP-E is a processive bi-directional tracker of dynamic microtubule tips. *Nat Cell Biol* 15, 1079-1088.
- Guillermet-Guibert, J., Davenne, L., Pchejetski, D., Saint-Laurent, N., Brizuela, L., Guilbeau-Frugier, C., Delisle, M.B., Cuvillier, O., Susini, C., and Bousquet, C. (2009). Targeting the sphingolipid

metabolism to defeat pancreatic cancer cell resistance to the chemotherapeutic gemcitabine drug. *Mol Cancer Ther* 8, 809-820.

Habu, T., Kim, S.H., Weinstein, J., and Matsumoto, T. (2002). Identification of a MAD2-binding protein, CMT2, and its role in mitosis. *The EMBO journal* 21, 6419-6428.

Hait, N.C., Allegood, J., Maceyka, M., Strub, G.M., Harikumar, K.B., Singh, S.K., Luo, C., Marmorstein, R., Kordula, T., Milstien, S., *et al.* (2009). Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science* 325, 1254-1257.

Hait, N.C., 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, N.C., Sarkar, S., Le Stunff, H., Mikami, A., Maceyka, M., Milstien, S., and Spiegel, S. (2005). Role of sphingosine kinase 2 in cell migration toward epidermal growth factor. *J Biol Chem* 280, 29462-29469.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 139-150.

Hanson, M.A., Roth, C.B., Jo, E., Griffith, M.T., Scott, F.L., Reinhart, G., Desale, H., Clemons, B., Cahalan, S.M., Schuerer, S.C., *et al.* (2012). Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science* 335, 851-855.

Hayashi, S., Okada, T., Igarashi, N., Fujita, T., Jahangeer, S., and Nakamura, S. (2002). Identification and characterization of RPK118, a novel sphingosine kinase-1-binding protein. *J Biol Chem* 277, 33319-33324.

Hayne, C., Tzivion, G., and Luo, Z. (2000). Raf-1/MEK/MAPK pathway is necessary for the G2/M transition induced by nocodazole. *J Biol Chem* 275, 31876-31882.

Heffernan-Stroud, L.A., Helke, K.L., Jenkins, R.W., De Costa, A.M., Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2012). Defining a role for sphingosine kinase 1 in p53-dependent tumors. *Oncogene* 31, 1166-1175.

Heffernan-Stroud, L.A., and Obeid, L.M. (2011). p53 and regulation of bioactive sphingolipids. *Advances in enzyme regulation* 51, 219-228.

Heilig, C.E., Loffler, H., Mahlke, U., Janssen, J.W., Ho, A.D., Jauch, A., and Kramer, A. (2010). Chromosomal instability correlates with poor outcome in patients with myelodysplastic syndromes irrespectively of the cytogenetic risk group. *Journal of cellular and molecular medicine* 14, 895-902.

Heinrich, S., Windecker, H., Hustedt, N., and Hauf, S. (2012). Mph1 kinetochore localization is crucial and upstream in the hierarchy of spindle assembly checkpoint protein recruitment to kinetochores. *J Cell Sci* 125, 4720-4727.

Herr, D.R., Fyrst, H., Creason, M.B., Phan, V.H., Saba, J.D., and Harris, G.L. (2004). Characterization of the *Drosophila* sphingosine kinases and requirement for Sk2 in normal reproductive function. *J Biol Chem* 279, 12685-12694.

Hewitt, L., Tighe, A., Santaguida, S., White, A.M., Jones, C.D., Musacchio, A., Green, S., and Taylor, S.S. (2010). Sustained Mps1 activity is required in mitosis to recruit O-Mad2 to the Mad1-C-Mad2 core complex. *J Cell Biol* 190, 25-34.

- Hibbs, K., Skubitz, K.M., Pambuccian, S.E., Casey, R.C., Burleson, K.M., Oegema, T.R., Jr., Thiele, J.J., Grindle, S.M., Bliss, R.L., and Skubitz, A.P. (2004). Differential gene expression in ovarian carcinoma: identification of potential biomarkers. *Am J Pathol* 165, 397-414.
- Hinchcliffe, E.H., and Sluder, G. (2002). Two for two: Cdk2 and its role in centrosome doubling. *Oncogene* 21, 6154-6160.
- Hirota, T., Lipp, J.J., Toh, B.H., and Peters, J.M. (2005). Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature* 438, 1176-1180.
- 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., and Brinkmann, V. (2011). Sphingosine 1-phosphate (S1P): Physiology and the effects of S1P receptor modulation. *Neurology* 76, S3-8.
- 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.
- Hoffman, D.B., Pearson, C.G., Yen, T.J., Howell, B.J., and Salmon, E.D. (2001). Microtubule-dependent changes in assembly of microtubule motor proteins and mitotic spindle checkpoint proteins at PtK1 kinetochores. *Mol Biol Cell* 12, 1995-2009.
- Holland, A.J., and Cleveland, D.W. (2012). Losing balance: the origin and impact of aneuploidy in cancer. *EMBO reports* 13, 501-514.
- Holland, W.L., Bikman, B.T., Wang, L.P., Yuguang, G., Sargent, K.M., Bulchand, S., Knotts, T.A., Shui, G., Clegg, D.J., Wenk, M.R., *et al.* (2011a). Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J Clin Invest* 121, 1858-1870.
- Holland, W.L., Miller, R.A., Wang, Z.V., Sun, K., Barth, B.M., Bui, H.H., Davis, K.E., Bikman, B.T., Halberg, N., Rutkowski, J.M., *et al.* (2011b). Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nat Med* 17, 55-63.
- Howell, B.J., McEwen, B.F., Canman, J.C., Hoffman, D.B., Farrar, E.M., Rieder, C.L., and Salmon, E.D. (2001). Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *J Cell Biol* 155, 1159-1172.
- Hoyt, M.A., Totis, L., and Roberts, B.T. (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* 66, 507-517.
- Huang, H.C., Shi, J., Orth, J.D., and Mitchison, T.J. (2009). Evidence that mitotic exit is a better cancer therapeutic target than spindle assembly. *Cancer Cell* 16, 347-358.
- Hung, J.H., Lu, Y.S., Wang, Y.C., Ma, Y.H., Wang, D.S., Kulp, S.K., Muthusamy, N., Byrd, J.C., Cheng, A.L., and Chen, C.S. (2008). FTY720 induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells through activation of protein kinase C delta signaling. *Cancer Res* 68, 1204-1212.
- Hwang, L.H., Lau, L.F., Smith, D.L., Mistrot, C.A., Hardwick, K.G., Hwang, E.S., Amon, A., and Murray, A.W. (1998). Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint. *Science* 279, 1041-1044.
- Igarashi, N., Okada, T., Hayashi, S., Fujita, T., Jahangeer, S., and Nakamura, S. (2003). Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. *J Biol Chem* 278, 46832-46839.

- Igarashi, Y., Hakomori, S., Toyokuni, T., Dean, B., Fujita, S., Sugimoto, M., Ogawa, T., el-Ghendy, K., and Racker, E. (1989). Effect of chemically well-defined sphingosine and its N-methyl derivatives on protein kinase C and src kinase activities. *Biochemistry* 28, 6796-6800.
- Ikeda, H., Watanabe, N., Ishii, I., Shimosawa, T., Kume, Y., Tomiya, T., Inoue, Y., Nishikawa, T., Ohtomo, N., Tanoue, Y., *et al.* (2009). Sphingosine 1-phosphate regulates regeneration and fibrosis after liver injury via sphingosine 1-phosphate receptor 2. *J Lipid Res* 50, 556-564.
- Im, D.S., Clemens, J., Macdonald, T.L., and Lynch, K.R. (2001). Characterization of the human and mouse sphingosine 1-phosphate receptor, S1P5 (Edg-8): structure-activity relationship of sphingosine1-phosphate receptors. *Biochemistry* 40, 14053-14060.
- 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., Li, P.Y., Wada, A., Mitsutake, S., and Igarashi, Y. (2003). Identification of functional nuclear export sequences in human sphingosine kinase 1. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 168-173.
- Jacks, T., Remington, L., Williams, B.O., Schmitt, E.M., Halachmi, S., Bronson, R.T., and Weinberg, R.A. (1994). Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 4, 1-7.
- Jaillard, C., Harrison, S., Stankoff, B., Aigrot, M.S., Calver, A.R., Duddy, G., Walsh, F.S., Pangalos, M.N., Arimura, N., Kaibuchi, K., *et al.* (2005). Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *J Neurosci* 25, 1459-1469.
- Janssen, A., Kops, G.J., and Medema, R.H. (2009). Elevating the frequency of chromosome mis-segregation as a strategy to kill tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19108-19113.
- Jarman, K.E., Moretti, P.A., Zebol, J.R., and Pitson, S.M. (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.
- Jeganathan, K., Malureanu, L., Baker, D.J., Abraham, S.C., and van Deursen, J.M. (2007). Bub1 mediates cell death in response to chromosome missegregation and acts to suppress spontaneous tumorigenesis. *J Cell Biol* 179, 255-267.
- Jelluma, N., Brenkman, A.B., van den Broek, N.J., Cruijssen, C.W., van Osch, M.H., Lens, S.M., Medema, R.H., and Kops, G.J. (2008). Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment. *Cell* 132, 233-246.
- Johnson, K.R., Johnson, K.Y., Crellin, H.G., Ogretmen, B., Boylan, A.M., Harley, R.A., and Obeid, L.M. (2005). Immunohistochemical distribution of sphingosine kinase 1 in normal and tumor lung tissue. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 53, 1159-1166.
- Jordan, M.A., and Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature reviews Cancer* 4, 253-265.
- Kabashima, K., Haynes, N.M., Xu, Y., Nutt, S.L., Allende, M.L., Proia, R.L., and Cyster, J.G. (2006). Plasma cell S1P1 expression determines secondary lymphoid organ retention versus bone marrow tropism. *J Exp Med* 203, 2683-2690.
- Kaestner, P., and Bastians, H. (2010). Mitotic drug targets. *J Cell Biochem* 111, 258-265.
- Kapitonov, D., Allegood, J.C., Mitchell, C., Hait, N.C., Almenara, J.A., Adams, J.K., Zipkin, R.E., Dent, P., Kordula, T., Milstien, S., *et al.* (2009). Targeting sphingosine kinase 1 inhibits Akt signaling,

induces apoptosis, and suppresses growth of human glioblastoma cells and xenografts. *Cancer Res* 69, 6915-6923.

Kastan, M.B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316-323.

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., Osta, W., Johnson, K.R., Pettus, B.J., Bielawski, J., Tanaka, T., Wargovich, M.J., Reddy, B.S., Hannun, Y.A., Obeid, L.M., *et al.* (2006). Sphingosine kinase 1 is up-regulated in colon carcinogenesis. *Faseb J* 20, 386-388.

Kawashima, S.A., Yamagishi, Y., Honda, T., Ishiguro, K., and Watanabe, Y. (2010). Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin. *Science* 327, 172-177.

Keenan, R.W., and Maxam, A. (1969). The in vitro degradation of dihydrosphingosine. *Biochim Biophys Acta* 176, 348-356.

Kelly, A.E., Ghenoiu, C., Xue, J.Z., Zierhut, C., Kimura, H., and Funabiki, H. (2010). Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine 3 to activate the mitotic kinase Aurora B. *Science* 330, 235-239.

Keul, P., Lucke, S., von Wnuck Lipinski, K., Bode, C., Graler, M., Heusch, G., and Levkau, B. (2011). Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes recruitment of monocyte/macrophages in inflammation and atherosclerosis. *Circ Res* 108, 314-323.

Khan, S.H., and Wahl, G.M. (1998). p53 and pRb prevent rereplication in response to microtubule inhibitors by mediating a reversible G1 arrest. *Cancer Res* 58, 396-401.

Kharel, Y., Lee, S., Snyder, A.H., Sheasley-O'Neill S, L., Morris, M.A., Setiady, Y., Zhu, R., Zigler, M.A., Burcin, T.L., Ley, K., *et al.* (2005). Sphingosine kinase 2 is required for modulation of lymphocyte traffic by FTY720. *J Biol Chem* 280, 36865-36872.

Khodjakov, A., and Pines, J. (2010). Centromere tension: a divisive issue. *Nat Cell Biol* 12, 919-923.

Kim, E.S., Kim, J.S., Kim, S.G., Hwang, S., Lee, C.H., and Moon, A. (2011). Sphingosine 1-phosphate regulates matrix metalloproteinase-9 expression and breast cell invasion through S1P3-Galphaq coupling. *J Cell Sci* 124, 2220-2230.

Kim, S.H., Lin, D.P., Matsumoto, S., Kitazono, A., and Matsumoto, T. (1998). Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *Science* 279, 1045-1047.

King, C.C., Zenke, F.T., Dawson, P.E., Dutil, E.M., Newton, A.C., Hemmings, B.A., and Bokoch, G.M. (2000a). Sphingosine is a novel activator of 3-phosphoinositide-dependent kinase 1. *J Biol Chem* 275, 18108-18113.

King, J.M., Hays, T.S., and Nicklas, R.B. (2000b). Dynein is a transient kinetochore component whose binding is regulated by microtubule attachment, not tension. *J Cell Biol* 151, 739-748.

King, R.W. (2008). When 2+2=5: the origins and fates of aneuploid and tetraploid cells. *Biochim Biophys Acta* 1786, 4-14.

Kiyomitsu, T., Obuse, C., and Yanagida, M. (2007). Human Blinkin/AF15q14 is required for chromosome alignment and the mitotic checkpoint through direct interaction with Bub1 and BubR1. *Dev Cell* 13, 663-676.

- Kleuser, B., Cuvillier, O., and Spiegel, S. (1998). 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits programmed cell death in HL-60 cells by activation of sphingosine kinase. *Cancer Res* 58, 1817-1824.
- Kleuser, B., Maceyka, M., Milstien, S., and Spiegel, S. (2001). Stimulation of nuclear sphingosine kinase activity by platelet-derived growth factor. *FEBS Lett* 503, 85-90.
- Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M.M., Dickson, R., and Spiegel, S. (1998). Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J Biol Chem* 273, 23722-23728.
- Kohno, M., Momoi, M., Oo, M.L., Paik, J.H., Lee, Y.M., Venkataraman, K., Ai, Y., Ristimaki, A.P., Fyrst, H., Sano, H., *et al.* (2006). Intracellular role for sphingosine kinase 1 in intestinal adenoma cell proliferation. *Mol Cell Biol* 26, 7211-7223.
- Kono, K., Sugiura, M., and Kohama, T. (2002). Inhibition of recombinant sphingosine kinases by novel inhibitors of microbial origin, F-12509A and B-5354c. *The Journal of antibiotics* 55, 99-103.
- Kono, K., Tanaka, M., Ogita, T., Hosoya, T., and Kohama, T. (2000a). F-12509A, a new sphingosine kinase inhibitor, produced by a discomycete. *The Journal of antibiotics* 53, 459-466.
- Kono, K., Tanaka, M., Ogita, T., and Kohama, T. (2000b). Characterization of B-5354c, a new sphingosine kinase inhibitor, produced by a marine bacterium. *The Journal of antibiotics* 53, 759-764.
- Kono, M., Belyantseva, I.A., Skoura, A., Frolenkov, G.I., Starost, M.F., Dreier, J.L., Lidington, D., Bolz, S.S., Friedman, T.B., Hla, T., *et al.* (2007). Deafness and stria vascularis defects in S1P2 receptor-null mice. *J Biol Chem* 282, 10690-10696.
- Kops, G.J., Foltz, D.R., and Cleveland, D.W. (2004). Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8699-8704.
- Kops, G.J., Kim, Y., Weaver, B.A., Mao, Y., McLeod, I., Yates, J.R., 3rd, Tagaya, M., and Cleveland, D.W. (2005). ZW10 links mitotic checkpoint signaling to the structural kinetochore. *J Cell Biol* 169, 49-60.
- Kotelevets, N., Fabbro, D., Huwiler, A., and Zangemeister-Wittke, U. (2012). Targeting Sphingosine Kinase 1 in Carcinoma Cells Decreases Proliferation and Survival by Compromising PKC Activity and Cytokinesis. *PLoS One* 7, e39209.
- Kothapalli, R., Kusmartseva, I., and Loughran, T.P. (2002). Characterization of a human sphingosine-1-phosphate receptor gene (S1P5) and its differential expression in LGL leukemia. *Biochim Biophys Acta* 1579, 117-123.
- Kunda, P., and Baum, B. (2009). The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning. *Trends Cell Biol* 19, 174-179.
- Kwiatkowski, N., Jelluma, N., Filippakopoulos, P., Soundararajan, M., Manak, M.S., Kwon, M., Choi, H.G., Sim, T., Deveraux, Q.L., Rottmann, S., *et al.* (2010). Small-molecule kinase inhibitors provide insight into Mps1 cell cycle function. *Nature chemical biology* 6, 359-368.
- Lahiri, S., Park, H., Laviad, E.L., Lu, X., Bittman, R., and Futerman, A.H. (2009). Ceramide synthesis is modulated by the sphingosine analog FTY720 via a mixture of uncompetitive and noncompetitive inhibition in an Acyl-CoA chain length-dependent manner. *J Biol Chem* 284, 16090-16098.
- LaMontagne, K., Littlewood-Evans, A., Schnell, C., O'Reilly, T., Wyder, L., Sanchez, T., Probst, B., Butler, J., Wood, A., Liau, G., *et al.* (2006). Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization. *Cancer Res* 66, 221-231.
- Lampert, F., Hornung, P., and Westermann, S. (2010). The Dam1 complex confers microtubule plus end-tracking activity to the Ndc80 kinetochore complex. *J Cell Biol* 189, 641-649.

- Lampson, M.A., and Cheeseman, I.M. (2011). Sensing centromere tension: Aurora B and the regulation of kinetochore function. *Trends Cell Biol* 21, 133-140.
- Lampson, M.A., Renduchitala, K., Khodjakov, A., and Kapoor, T.M. (2004). Correcting improper chromosome-spindle attachments during cell division. *Nat Cell Biol* 6, 232-237.
- Lanni, J.S., and Jacks, T. (1998). Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption. *Mol Cell Biol* 18, 1055-1064.
- Lanterman, M.M., and Saba, J.D. (1998). Characterization of sphingosine kinase (SK) activity in *Saccharomyces cerevisiae* and isolation of SK-deficient mutants. *Biochem J* 332 (Pt 2), 525-531.
- Laviad, E.L., Albee, L., Pankova-Kholmyansky, I., Epstein, S., Park, H., Merrill, A.H., Jr., and Futerman, A.H. (2008). Characterization of ceramide synthase 2: tissue distribution, substrate specificity, and inhibition by sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem* 283, 5677-5684.
- Lavieu, G., Scarlatti, F., Sala, G., Carpentier, S., Levade, T., Ghidoni, R., Botti, J., and Codogno, P. (2006). Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation. *J Biol Chem* 281, 8518-8527.
- Leclercq, T.M., Moretti, P.A., and Pitson, S.M. (2011). Guanine nucleotides regulate sphingosine kinase 1 activation by eukaryotic elongation factor 1A and provide a mechanism for eEF1A-associated oncogenesis. *Oncogene* 30, 372-378.
- Leclercq, T.M., Moretti, P.A., Vadas, M.A., and Pitson, S.M. (2008). Eukaryotic elongation factor 1A interacts with sphingosine kinase and directly enhances its catalytic activity. *J Biol Chem* 283, 9606-9614.
- Lee, H., Deng, J., Kujawski, M., Yang, C., Liu, Y., Herrmann, A., Kortylewski, M., Horne, D., Somlo, G., Forman, S., *et al.* (2010). STAT3-induced S1PR1 expression is crucial for persistent STAT3 activation in tumors. *Nat Med* 16, 1421-1428.
- Lee, M.J., Evans, M., and Hla, T. (1996). The inducible G protein-coupled receptor edg-1 signals via the G(i)/mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 271, 11272-11279.
- Lee, M.J., Thangada, S., Claffey, K.P., Ancellin, N., Liu, C.H., Kluk, M., Volpi, M., Sha'afi, R.I., and Hla, T. (1999a). Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 99, 301-312.
- Lee, O.H., Kim, Y.M., Lee, Y.M., Moon, E.J., Lee, D.J., Kim, J.H., Kim, K.W., and Kwon, Y.G. (1999b). Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 743-750.
- 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.
- Levkau, B., Hermann, S., Theilmeyer, G., van der Giet, M., Chun, J., Schober, O., and Schafers, M. (2004). High-density lipoprotein stimulates myocardial perfusion in vivo. *Circulation* 110, 3355-3359.
- Li, J., Guan, H.Y., Gong, L.Y., Song, L.B., Zhang, N., Wu, J., Yuan, J., Zheng, Y.J., Huang, Z.S., and Li, M. (2008). Clinical significance of sphingosine kinase-1 expression in human astrocytomas progression and overall patient survival. *Clin Cancer Res* 14, 6996-7003.
- Li, R., and Murray, A.W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 66, 519-531.
- Li, W., Yu, C.P., Xia, J.T., Zhang, L., Weng, G.X., Zheng, H.Q., Kong, Q.L., Hu, L.J., Zeng, M.S., Zeng, Y.X., *et al.* (2009). Sphingosine kinase 1 is associated with gastric cancer progression and poor survival of patients. *Clin Cancer Res* 15, 1393-1399.

- Liang, J., Nagahashi, M., Kim, E.Y., Harikumar, K.B., Yamada, A., Huang, W.C., Hait, N.C., Allegood, J.C., Price, M.M., Avni, D., *et al.* (2013). Sphingosine-1-phosphate links persistent STAT3 activation, chronic intestinal inflammation, and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 23, 107-120.
- Lima, S., and Spiegel, S. (2013). Sphingosine kinase: a closer look at last. *Structure* 21, 690-692.
- Liu, D., Vader, G., Vromans, M.J., Lampson, M.A., and Lens, S.M. (2009). Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of aurora B kinase from kinetochore substrates. *Science* 323, 1350-1353.
- Liu, H., Sugiura, M., Nava, V.E., Edsall, L.C., Kono, K., Poulton, S., Milstien, S., Kohama, T., and Spiegel, S. (2000). Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J Biol Chem* 275, 19513-19520.
- Liu, H., Toman, R.E., Goparaju, S.K., Maceyka, M., Nava, V.E., Sankala, H., Payne, S.G., Bektas, M., Ishii, I., Chun, J., *et al.* (2003). Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis. *J Biol Chem* 278, 40330-40336.
- London, N., Ceto, S., Ranish, J.A., and Biggins, S. (2012). Phosphoregulation of Spc105 by Mps1 and PP1 regulates Bub1 localization to kinetochores. *Curr Biol* 22, 900-906.
- Long, J.S., Natarajan, V., Tigyi, G., Pyne, S., and Pyne, N.J. (2006). The functional PDGFbeta receptor-S1P1 receptor signaling complex is involved in regulating migration of mouse embryonic fibroblasts in response to platelet derived growth factor. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 80, 74-80.
- Lorca, T., and Castro, A. (2013). The Greatwall kinase: a new pathway in the control of the cell cycle. *Oncogene* 32, 537-543.
- Louie, D.D., Kisic, A., and Schroefler, G.J., Jr. (1976). Sphingolipid base metabolism. Partial purification and properties of sphinganine kinase of brain. *J Biol Chem* 251, 4557-4564.
- Loveridge, C., Tonelli, F., Leclercq, T., Lim, K.G., Long, J.S., Berdyshev, E., Tate, R.J., Natarajan, V., Pitson, S.M., Pyne, N.J., *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.
- Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M., and Beach, D. (1991). mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell* 64, 1111-1122.
- Ma, H.T., and Poon, R.Y. (2011). Synchronization of HeLa cells. *Methods Mol Biol* 761, 151-161.
- Maceyka, M., Alvarez, S.E., 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, K.B., Milstien, S., and Spiegel, S. (2012). Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol* 22, 50-60.
- Maceyka, M., Nava, V.E., Milstien, S., and Spiegel, S. (2004). Aminoacylase 1 is a sphingosine kinase 1-interacting protein. *FEBS Lett* 568, 30-34.
- Maceyka, M., Payne, S.G., Milstien, S., and Spiegel, S. (2002). Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585, 193-201.

- Maceyka, M., Sankala, H., Hait, N.C., Le Stunff, H., Liu, H., Toman, R., Collier, C., Zhang, M., Satin, L.S., Merrill, A.H., Jr., *et al.* (2005). SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem* *280*, 37118-37129.
- Maciejowski, J., George, K.A., Terret, M.E., Zhang, C., Shokat, K.M., and Jallepalli, P.V. (2010). Mps1 directs the assembly of Cdc20 inhibitory complexes during interphase and mitosis to control M phase timing and spindle checkpoint signaling. *J Cell Biol* *190*, 89-100.
- MacLennan, A.J., Browe, C.S., Gaskin, A.A., Lado, D.C., and Shaw, G. (1994). Cloning and characterization of a putative G-protein coupled receptor potentially involved in development. *Molecular and cellular neurosciences* *5*, 201-209.
- MacLennan, A.J., Carney, P.R., Zhu, W.J., Chaves, A.H., Garcia, J., Grimes, J.R., Anderson, K.J., Roper, S.N., and Lee, N. (2001). An essential role for the H218/AGR16/Edg-5/LP(B2) sphingosine 1-phosphate receptor in neuronal excitability. *The European journal of neuroscience* *14*, 203-209.
- Magidson, V., O'Connell, C.B., Loncarek, J., Paul, R., Mogilner, A., and Khodjakov, A. (2011). The spatial arrangement of chromosomes during prometaphase facilitates spindle assembly. *Cell* *146*, 555-567.
- Maiato, H., DeLuca, J., Salmon, E.D., and Earnshaw, W.C. (2004). The dynamic kinetochore-microtubule interface. *J Cell Sci* *117*, 5461-5477.
- Maines, L.W., Fitzpatrick, L.R., French, K.J., Zhuang, Y., Xia, Z., Keller, S.N., Upson, J.J., and Smith, C.D. (2008). Suppression of ulcerative colitis in mice by orally available inhibitors of sphingosine kinase. *Digestive diseases and sciences* *53*, 997-1012.
- Maines, L.W., Fitzpatrick, L.R., Green, C.L., Zhuang, Y., and Smith, C.D. (2010). Efficacy of a novel sphingosine kinase inhibitor in experimental Crohn's disease. *Inflammopharmacology* *18*, 73-85.
- Malavaud, B., Pchejetski, D., Mazerolles, C., de Paiva, G.R., Calvet, C., Doumerc, N., Pitson, S., Rischmann, P., and Cuvillier, O. (2010). Sphingosine kinase-1 activity and expression in human prostate cancer resection specimens. *Eur J Cancer* *46*, 3417-3424.
- Malchinkhuu, E., Sato, K., Maehama, T., Mogi, C., Tomura, H., Ishiuchi, S., Yoshimoto, Y., Kurose, H., and Okajima, F. (2008). S1P(2) receptors mediate inhibition of glioma cell migration through Rho signaling pathways independent of PTEN. *Biochem Biophys Res Commun* *366*, 963-968.
- Maldonado, M., and Kapoor, T.M. (2011). Constitutive Mad1 targeting to kinetochores uncouples checkpoint signalling from chromosome biorientation. *Nat Cell Biol* *13*, 475-482.
- Malek, R.L., Toman, R.E., Edsall, L.C., Wong, S., Chiu, J., Letterle, C.A., Van Brocklyn, J.R., Milstien, S., Spiegel, S., and Lee, N.H. (2001). Nrg-1 belongs to the endothelial differentiation gene family of G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. *J Biol Chem* *276*, 5692-5699.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* *30*, 630-641.
- Manchado, E., Guillaumot, M., de Carcer, G., Eguren, M., Trickey, M., Garcia-Higuera, I., Moreno, S., Yamano, H., Canamero, M., and Malumbres, M. (2010). Targeting mitotic exit leads to tumor regression in vivo: Modulation by Cdk1, Mastl, and the PP2A/B55alpha,delta phosphatase. *Cancer Cell* *18*, 641-654.
- Manchado, E., Guillaumot, M., and Malumbres, M. (2012). Killing cells by targeting mitosis. *Cell Death Differ* *19*, 369-377.

- Mandala, S., Hajdu, R., Bergstrom, J., Quackenbush, E., Xie, J., Milligan, J., Thornton, R., Shei, G.J., Card, D., Keohane, C., *et al.* (2002). Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 296, 346-349.
- Mansfeld, J., Collin, P., Collins, M.O., Choudhary, J.S., and Pines, J. (2011). APC15 drives the turnover of MCC-CDC20 to make the spindle assembly checkpoint responsive to kinetochore attachment. *Nat Cell Biol* 13, 1234-1243.
- Maresca, T.J., and Salmon, E.D. (2009). Intrakinetochore stretch is associated with changes in kinetochore phosphorylation and spindle assembly checkpoint activity. *J Cell Biol* 184, 373-381.
- Marzo, I., and Naval, J. (2013). Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: promises and pitfalls. *Biochem Pharmacol* 86, 703-710.
- Mastrandrea, L.D., Sessanna, S.M., and Laychock, S.G. (2005). Sphingosine kinase activity and sphingosine-1 phosphate production in rat pancreatic islets and INS-1 cells: response to cytokines. *Diabetes* 54, 1429-1436.
- Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M.L., Proia, R.L., and Cyster, J.G. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427, 355-360.
- Matsuoka, Y., Nagahara, Y., Ikekita, M., and Shinomiya, T. (2003). A novel immunosuppressive agent FTY720 induced Akt dephosphorylation in leukemia cells. *Br J Pharmacol* 138, 1303-1312.
- Mayol, K., Bijoux, V., Marvel, J., Balabanian, K., and Walzer, T. (2011). Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking. *Blood* 118, 4863-4871.
- Mazurek, N., Megidish, T., Hakomori, S., and Igarashi, Y. (1994). Regulatory effect of phorbol esters on sphingosine kinase in BALB/C 3T3 fibroblasts (variant A31): demonstration of cell type-specific response--a preliminary note. *Biochem Biophys Res Commun* 198, 1-9.
- McClelland, S.E., Burrell, R.A., and Swanton, C. (2009). Chromosomal instability: a composite phenotype that influences sensitivity to chemotherapy. *Cell Cycle* 8, 3262-3266.
- McCudden, C.R., Hains, M.D., Kimple, R.J., Siderovski, D.P., and Willard, F.S. (2005). G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci* 62, 551-577.
- Meadows, J.C., Shepperd, L.A., Vanoosthuysen, V., Lancaster, T.C., Sochaj, A.M., Buttrick, G.J., Hardwick, K.G., and Millar, J.B. (2011). Spindle checkpoint silencing requires association of PP1 to both Spc7 and kinesin-8 motors. *Dev Cell* 20, 739-750.
- Means, C.K., Xiao, C.Y., Li, Z., Zhang, T., Omens, J.H., Ishii, I., Chun, J., and Brown, J.H. (2007). Sphingosine 1-phosphate S1P2 and S1P3 receptor-mediated Akt activation protects against in vivo myocardial ischemia-reperfusion injury. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 292, H2944-2951.
- Megidish, T., White, T., Takio, K., Titani, K., Igarashi, Y., and Hakomori, S. (1995). The signal modulator protein 14-3-3 is a target of sphingosine- or N,N-dimethylsphingosine-dependent kinase in 3T3(A31) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 216, 739-747.
- Melendez, A., Floto, R.A., Gillooly, D.J., Harnett, M.M., and Allen, J.M. (1998). FcγRI coupling to phospholipase D initiates sphingosine kinase-mediated calcium mobilization and vesicular trafficking. *J Biol Chem* 273, 9393-9402.
- Melendez, A.J., Carlos-Dias, E., Gosink, M., Allen, J.M., and Takacs, L. (2000). Human sphingosine kinase: molecular cloning, functional characterization and tissue distribution. *Gene* 251, 19-26.

- Meraldi, P., Draviam, V.M., and Sorger, P.K. (2004). Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. *Dev Cell* 7, 45-60.
- Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Alemany, R., Laser, K.T., Neumann, E., Zhang, C., Schmidt, M., Rauen, U., Jakobs, K.H., and van Koppen, C.J. (1998). Sphingosine kinase-mediated Ca²⁺ signalling by G-protein-coupled receptors. *The EMBO journal* 17, 2830-2837.
- Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Kuchar, I., Alemany, R., Guo, Y., Schmidt, M., and Jakobs, K.H. (1999). Role of sphingosine kinase in Ca²⁺ signalling by epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett* 461, 217-222.
- Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Kuchar, I., Lipinski, M., Alemany, R., Rumenapp, U., and Jakobs, K.H. (2001). Stimulation of intracellular sphingosine-1-phosphate production by G-protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. *European journal of pharmacology* 414, 145-154.
- Meyer zu Heringdorf, D., Liliom, K., Schaefer, M., Danneberg, K., Jaggar, J.H., Tigyi, G., and Jakobs, K.H. (2003). Photolysis of intracellular caged sphingosine-1-phosphate causes Ca²⁺ mobilization independently of G-protein-coupled receptors. *FEBS Lett* 554, 443-449.
- Michel, L., Benezra, R., and Diaz-Rodriguez, E. (2004a). MAD2 dependent mitotic checkpoint defects in tumorigenesis and tumor cell death: a double edged sword. *Cell Cycle* 3, 990-992.
- Michel, L., Diaz-Rodriguez, E., Narayan, G., Hernando, E., Murty, V.V., and Benezra, R. (2004b). Complete loss of the tumor suppressor MAD2 causes premature cyclin B degradation and mitotic failure in human somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4459-4464.
- Michel, L.S., Liberal, V., Chatterjee, A., Kirchwegger, R., Pasche, B., Gerald, W., Dobles, M., Sorger, P.K., Murty, V.V., and Benezra, R. (2001). MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* 409, 355-359.
- Milhas, D., Clarke, C.J., and Hannun, Y.A. (2010). Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: implications for bioactive sphingolipids. *FEBS Lett* 584, 1887-1894.
- Miller, A.V., Alvarez, S.E., Spiegel, S., and Lebman, D.A. (2008). Sphingosine kinases and sphingosine-1-phosphate are critical for transforming growth factor beta-induced extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation and promotion of migration and invasion of esophageal cancer cells. *Mol Cell Biol* 28, 4142-4151.
- Min, J., Stegner, A.L., Alexander, H., and Alexander, S. (2004). Overexpression of sphingosine-1-phosphate lyase or inhibition of sphingosine kinase in *Dictyostelium discoideum* results in a selective increase in sensitivity to platinum-based chemotherapy drugs. *Eukaryot Cell* 3, 795-805.
- Min, J., Traynor, D., Stegner, A.L., Zhang, L., Hanigan, M.H., Alexander, H., and Alexander, S. (2005). Sphingosine kinase regulates the sensitivity of *Dictyostelium discoideum* cells to the anticancer drug cisplatin. *Eukaryot Cell* 4, 178-189.
- Minn, A.J., Boise, L.H., and Thompson, C.B. (1996). Expression of Bcl-xL and loss of p53 can cooperate to overcome a cell cycle checkpoint induced by mitotic spindle damage. *Genes & development* 10, 2621-2631.
- Mizugishi, K., Yamashita, T., Olivera, A., Miller, G.F., Spiegel, S., and Proia, R.L. (2005). Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol* 25, 11113-11121.
- Mochida, S., and Hunt, T. (2012). Protein phosphatases and their regulation in the control of mitosis. *EMBO reports* 13, 197-203.
- Mochida, S., Maslen, S.L., Skehel, M., and Hunt, T. (2010). Greatwall phosphorylates an inhibitor of protein phosphatase 2A that is essential for mitosis. *Science* 330, 1670-1673.

- Morais da Silva, S., Moutinho-Santos, T., and Sunkel, C.E. (2013). A tumor suppressor role of the Bub3 spindle checkpoint protein after apoptosis inhibition. *J Cell Biol* 201, 385-393.
- Morales-Ruiz, M., Lee, M.J., Zollner, S., Gratton, J.P., Scotland, R., Shiojima, I., Walsh, K., Hla, T., and Sessa, W.C. (2001). Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a Gi protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells. *J Biol Chem* 276, 19672-19677.
- Musacchio, A. (2011). Spindle assembly checkpoint: the third decade. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 366, 3595-3604.
- Musacchio, A., and Hardwick, K.G. (2002). The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 731-741.
- Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 379-393.
- Nagiec, M.M., Skrzypek, M., Nagiec, E.E., Lester, R.L., and Dickson, R.C. (1998). The LCB4 (YOR171c) and LCB5 (YLR260w) genes of *Saccharomyces* encode sphingoid long chain base kinases. *J Biol Chem* 273, 19437-19442.
- Nakayama, K.I., Hatakeyama, S., and Nakayama, K. (2001). Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27Kip1. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 853-860.
- Nava, V.E., Hobson, J.P., Murthy, S., Milstien, S., and Spiegel, S. (2002). Sphingosine kinase type 1 promotes estrogen-dependent tumorigenesis of breast cancer MCF-7 cells. *Exp Cell Res* 281, 115-127.
- Nava, V.E., Lacana, E., Poulton, S., Liu, H., Sugiura, M., Kono, K., Milstien, S., Kohama, T., and Spiegel, S. (2000). Functional characterization of human sphingosine kinase-1. *FEBS Lett* 473, 81-84.
- Neubauer, H.A., and Pitson, S.M. (2013). Roles, regulation and inhibitors of sphingosine kinase 2. *The FEBS journal*.
- Neviani, P., Santhanam, R., Oaks, J.J., Eiring, A.M., Notari, M., Blaser, B.W., Liu, S., Trotta, R., Muthusamy, N., Gambacorti-Passerini, C., *et al.* (2007). FTY720, a new alternative for treating blast crisis chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 117, 2408-2421.
- Nezi, L., and Musacchio, A. (2009). Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Current opinion in cell biology* 21, 785-795.
- Ng, C.K., Carr, K., McAinsh, M.R., Powell, B., and Hetherington, A.M. (2001). Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* 410, 596-599.
- Nicklas, R.B. (1997). How cells get the right chromosomes. *Science* 275, 632-637.
- Nicklas, R.B., Waters, J.C., Salmon, E.D., and Ward, S.C. (2001). Checkpoint signals in grasshopper meiosis are sensitive to microtubule attachment, but tension is still essential. *J Cell Sci* 114, 4173-4183.
- Nishiura, H., Tamura, K., Morimoto, Y., and Imai, H. (2000). Characterization of sphingolipid long-chain base kinase in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Soc Trans* 28, 747-748.
- Nofer, J.R., van der Giet, M., Tolle, M., Wolinska, I., von Wnuck Lipinski, K., Baba, H.A., Tietge, U.J., Godecke, A., Ishii, I., Kleuser, B., *et al.* (2004). HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest* 113, 569-581.

- Novgorodov, A.S., El-Alwani, M., Bielawski, J., Obeid, L.M., and Gudz, T.I. (2007). Activation of sphingosine-1-phosphate receptor S1P5 inhibits oligodendrocyte progenitor migration. *FASEB journal* 21, 1503-1514.
- Nurse, P. (1975). Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature* 256, 547-551.
- Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344, 503-508.
- Nyalendo, C., Michaud, M., Beaulieu, E., Roghi, C., Murphy, G., Gingras, D., and Beliveau, R. (2007). Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration. *J Biol Chem* 282, 15690-15699.
- O'Brien, N., Jones, S.T., Williams, D.G., Cunningham, H.B., Moreno, K., Visentin, B., Gentile, A., Vekich, J., Shestowsky, W., Hiraiwa, M., *et al.* (2009). Production and characterization of monoclonal anti-sphingosine-1-phosphate antibodies. *J Lipid Res* 50, 2245-2257.
- Okada, T., Ding, G., Sonoda, H., Kajimoto, T., Haga, Y., Khosrowbeygi, A., Gao, S., Miwa, N., Jahangeer, S., and Nakamura, S. (2005). Involvement of N-terminal-extended form of sphingosine kinase 2 in serum-dependent regulation of cell proliferation and apoptosis. *J Biol Chem* 280, 36318-36325.
- Okamoto, H., Takuwa, N., Gonda, K., Okazaki, H., Chang, K., Yatomi, Y., Shigematsu, H., and Takuwa, Y. (1998). EDG1 is a functional sphingosine-1-phosphate receptor that is linked via a Gi/o to multiple signaling pathways, including phospholipase C activation, Ca²⁺ mobilization, Ras-mitogen-activated protein kinase activation, and adenylate cyclase inhibition. *J Biol Chem* 273, 27104-27110.
- Okamoto, H., Yatomi, Y., Ohmori, T., Satoh, K., Matsumoto, Y., and Ozaki, Y. (2000). Sphingosine 1-phosphate stimulates G(i)- and Rho-mediated vascular endothelial cell spreading and migration. *Thrombosis research* 99, 259-265.
- Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L., Nava, V., Cuvillier, O., Poulton, S., and Spiegel, S. (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., and Spiegel, S. (1993). Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 365, 557-560.
- Olivera, A., and Spiegel, S. (1998). Sphingosine kinase. Assay and product analysis. *Methods Mol Biol* 105, 233-242.
- Olivera, A., Urtz, N., Mizugishi, K., Yamashita, Y., Gilfillan, A.M., Furumoto, Y., Gu, H., Proia, R.L., Baumruker, T., and Rivera, J. (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.
- Oskouian, B., Sooriyakumaran, P., Borowsky, A.D., Crans, A., Dillard-Telm, L., Tam, Y.Y., Bandhuvula, P., and Saba, J.D. (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.
- Palframan, W.J., Meehl, J.B., Jaspersen, S.L., Winey, M., and Murray, A.W. (2006). Anaphase inactivation of the spindle checkpoint. *Science* 313, 680-684.

Pappu, R., Schwab, S.R., Cornelissen, I., Pereira, J.P., Regard, J.B., Xu, Y., Camerer, E., Zheng, Y.W., Huang, Y., Cyster, J.G., *et al.* (2007). Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science* 316, 295-298.

Park, I., Lee, H.O., Choi, E., Lee, Y.K., Kwon, M.S., Min, J., Park, P.G., Lee, S., Kong, Y.Y., Gong, G., *et al.* (2013). Loss of BubR1 acetylation causes defects in spindle assembly checkpoint signaling and promotes tumor formation. *J Cell Biol* 202, 295-309.

Park, K.S., Kim, M.K., Lee, H.Y., Kim, S.D., Lee, S.Y., Kim, J.M., Ryu, S.H., and Bae, Y.S. (2007). S1P stimulates chemotactic migration and invasion in OVCAR3 ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 356, 239-244.

Paugh, S.W., Paugh, B.S., Rahmani, M., Kapitonov, D., Almenara, J.A., Kordula, T., Milstien, S., Adams, J.K., Zipkin, R.E., Grant, S., *et al.* (2008). A selective sphingosine kinase 1 inhibitor integrates multiple molecular therapeutic targets in human leukemia. *Blood* 112, 1382-1391.

Paweletz, N. (2001). Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 72-75.

Payne, S.G., Oskeritzian, C.A., Griffiths, R., Subramanian, P., Barbour, S.E., Chalfant, C.E., Milstien, S., and Spiegel, S. (2007). The immunosuppressant drug FTY720 inhibits cytosolic phospholipase A2 independently of sphingosine-1-phosphate receptors. *Blood* 109, 1077-1085.

Pchejetski, D., Doumerc, N., Golzio, M., Naymark, M., Teissie, J., Kohama, T., Waxman, J., Malavaud, B., and Cuvillier, O. (2008). Chemosensitizing effects of sphingosine kinase-1 inhibition in prostate cancer cell and animal models. *Mol Cancer Ther* 7, 1836-1845.

Pchejetski, D., Golzio, M., Bonhoure, E., Calvet, C., Doumerc, N., Garcia, V., Mazerolles, C., Rischmann, P., Teissie, J., Malavaud, B., *et al.* (2005). Sphingosine kinase-1 as a chemotherapy sensor in prostate adenocarcinoma cell and mouse models. *Cancer Res* 65, 11667-11675.

Perera, D., Tilston, V., Hopwood, J.A., Barchi, M., Boot-Handford, R.P., and Taylor, S.S. (2007). Bub1 maintains centromeric cohesion by activation of the spindle checkpoint. *Dev Cell* 13, 566-579.

Perez de Castro, I., de Carcer, G., and Malumbres, M. (2007). A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy. *Carcinogenesis* 28, 899-912.

Peters, J.M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 644-656.

Petrovic, A., Pasqualato, S., Dube, P., Krenn, V., Santaguida, S., Cittaro, D., Monzani, S., Massimiliano, L., Keller, J., Tarricone, A., *et al.* (2010). The MIS12 complex is a protein interaction hub for outer kinetochore assembly. *J Cell Biol* 190, 835-852.

Pham, T.H., Baluk, P., Xu, Y., Grigorova, I., Bankovich, A.J., Pappu, R., Coughlin, S.R., McDonald, D.M., Schwab, S.R., and Cyster, J.G. (2010). Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning. *J Exp Med* 207, 17-27.

Pihan, G.A., Wallace, J., Zhou, Y., and Doxsey, S.J. (2003). Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res* 63, 1398-1404.

Pines, J. (1999). Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat Cell Biol* 1, E73-79.

Pinsky, B.A., Kung, C., Shokat, K.M., and Biggins, S. (2006). The Ipl1-Aurora protein kinase activates the spindle checkpoint by creating unattached kinetochores. *Nat Cell Biol* 8, 78-83.

Pinsky, B.A., Nelson, C.R., and Biggins, S. (2009). Protein phosphatase 1 regulates exit from the spindle checkpoint in budding yeast. *Curr Biol* 19, 1182-1187.

- Pitman, M.R., and Pitson, S.M. (2010). Inhibitors of the sphingosine kinase pathway as potential therapeutics. *Current cancer drug targets* 10, 354-367.
- Pitson, S.M. (2011). Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling. *Trends Biochem Sci* 36, 97-107.
- Pitson, S.M., D'Andrea R, J., Vandeleur, L., Moretti, P.A., Xia, P., Gamble, J.R., Vadas, M.A., and Wattenberg, B.W. (2000a). Human sphingosine kinase: purification, molecular cloning and characterization of the native and recombinant enzymes. *Biochem J* 350 Pt 2, 429-441.
- Pitson, S.M., Moretti, P.A., Zebol, J.R., Lynn, H.E., Xia, P., Vadas, M.A., and Wattenberg, B.W. (2003). Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation. *The EMBO journal* 22, 5491-5500.
- Pitson, S.M., Moretti, P.A., Zebol, J.R., Xia, P., Gamble, J.R., Vadas, M.A., D'Andrea, R.J., and Wattenberg, B.W. (2000b). Expression of a catalytically inactive sphingosine kinase mutant blocks agonist-induced sphingosine kinase activation. A dominant-negative sphingosine kinase. *J Biol Chem* 275, 33945-33950.
- Pitson, S.M., Moretti, P.A., Zebol, J.R., Zareie, R., Derian, C.K., Darrow, A.L., Qi, J., D'Andrea, R.J., Bagley, C.J., Vadas, M.A., *et al.* (2002). The nucleotide-binding site of human sphingosine kinase 1. *J Biol Chem* 277, 49545-49553.
- Pitson, S.M., Xia, P., Leclercq, T.M., Moretti, P.A., Zebol, J.R., Lynn, H.E., Wattenberg, B.W., and Vadas, M.A. (2005). Phosphorylation-dependent translocation of sphingosine kinase to the plasma membrane drives its oncogenic signalling. *J Exp Med* 201, 49-54.
- Ponnusamy, S., Selvam, S.P., Mehrotra, S., Kawamori, T., Snider, A.J., Obeid, L.M., Shao, Y., Sabbadini, R., and Ogretmen, B. (2012). Communication between host organism and cancer cells is transduced by systemic sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signalling to regulate tumour metastasis. *EMBO molecular medicine* 4, 761-775.
- Posch, M., Khoudoli, G.A., Swift, S., King, E.M., Deluca, J.G., and Swedlow, J.R. (2010). Sds22 regulates aurora B activity and microtubule-kinetochore interactions at mitosis. *J Cell Biol* 191, 61-74.
- Potapova, T.A., Daum, J.R., Pittman, B.D., Hudson, J.R., Jones, T.N., Satinover, D.L., Stukenberg, P.T., and Gorbsky, G.J. (2006). The reversibility of mitotic exit in vertebrate cells. *Nature* 440, 954-958.
- Potapova, T.A., Zhu, J., and Li, R. (2013). Aneuploidy and chromosomal instability: a vicious cycle driving cellular evolution and cancer genome chaos. *Cancer metastasis reviews*.
- Pruett, S.T., Bushnev, A., Hagedorn, K., Adiga, M., Haynes, C.A., Sullards, M.C., Liotta, D.C., and Merrill, A.H., Jr. (2008). Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols. *J Lipid Res* 49, 1621-1639.
- Przewlaka, M.R., Venkei, Z., Bolanos-Garcia, V.M., Debski, J., Dadlez, M., and Glover, D.M. (2011). CENP-C is a structural platform for kinetochore assembly. *Curr Biol* 21, 399-405.
- Putkey, F.R., Cramer, T., Morphew, M.K., Silk, A.D., Johnson, R.S., McIntosh, J.R., and Cleveland, D.W. (2002). Unstable kinetochore-microtubule capture and chromosomal instability following deletion of CENP-E. *Dev Cell* 3, 351-365.
- Ramel, S., Sanchez, C.A., Schimke, M.K., Neshat, K., Cross, S.M., Raskind, W.H., and Reid, B.J. (1995). Inactivation of p53 and the development of tetraploidy in the elastase-SV40 T antigen transgenic mouse pancreas. *Pancreas* 11, 213-222.

- Rani, C.S., Wang, F., Fuior, E., Berger, A., Wu, J., Sturgill, T.W., Beitner-Johnson, D., LeRoith, D., Varticovski, L., and Spiegel, S. (1997). Divergence in signal transduction pathways of platelet-derived growth factor (PDGF) and epidermal growth factor (EGF) receptors. Involvement of sphingosine 1-phosphate in PDGF but not EGF signaling. *J Biol Chem* 272, 10777-10783.
- Reinhardt, H.C., and Yaffe, M.B. (2013). Phospho-Ser/Thr-binding domains: navigating the cell cycle and DNA damage response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 563-580.
- Ren, R., Mayer, B.J., Cicchetti, P., and Baltimore, D. (1993). Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 259, 1157-1161.
- Rieder, C.L., Cole, R.W., Khodjakov, A., and Sluder, G. (1995). The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J Cell Biol* 130, 941-948.
- Rigogliuso, S., Donati, C., Cassara, D., Taverna, S., Salamone, M., Bruni, P., and Vittorelli, M.L. (2010). An active form of sphingosine kinase-1 is released in the extracellular medium as component of membrane vesicles shed by two human tumor cell lines. *Journal of oncology* 2010, 509329.
- Rischitor, P.E., May, K.M., and Hardwick, K.G. (2007). Bub1 is a fission yeast kinetochore scaffold protein, and is sufficient to recruit other spindle checkpoint proteins to ectopic sites on chromosomes. *PLoS One* 2, e1342.
- Roberts, J.R., Rowe, P.A., and Demaine, A.G. (2002). Activation of NF-kappaB and MAP kinase cascades by hypothermic stress in endothelial cells. *Cryobiology* 44, 161-169.
- Rodgers, A., Mormeneo, D., Long, J.S., Delgado, A., Pyne, N.J., and Pyne, S. (2009). Sphingosine 1-phosphate regulation of extracellular signal-regulated kinase-1/2 in embryonic stem cells. *Stem cells and development* 18, 1319-1330.
- Rosen, H., Gonzalez-Cabrera, P.J., Sanna, M.G., and Brown, S. (2009). Sphingosine 1-phosphate receptor signaling. *Annual review of biochemistry* 78, 743-768.
- Rosenberg, J.S., Cross, F.R., and Funabiki, H. (2011). KNL1/Spc105 recruits PP1 to silence the spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* 21, 942-947.
- Ruchaud, S., Carmena, M., and Earnshaw, W.C. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 798-812.
- Ruckhaberle, E., Rody, A., Engels, K., Gaetje, R., von Minckwitz, G., Schiffmann, S., Grosch, S., Geisslinger, G., Holtrich, U., Karn, T., *et al.* (2008). Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 112, 41-52.
- Salas, A., Ponnusamy, S., Senkal, C.E., Meyers-Needham, M., Selvam, S.P., Saddoughi, S.A., Apohan, E., Sentelle, R.D., Smith, C., Gault, C.R., *et al.* (2011). Sphingosine kinase-1 and sphingosine 1-phosphate receptor 2 mediate Bcr-Abl1 stability and drug resistance by modulation of protein phosphatase 2A. *Blood* 117, 5941-5952.
- Salimian, K.J., Ballister, E.R., Smoak, E.M., Wood, S., Panchenko, T., Lampson, M.A., and Black, B.E. (2011). Feedback control in sensing chromosome biorientation by the Aurora B kinase. *Curr Biol* 21, 1158-1165.
- Samper, E., Morgado, L., Estrada, J.C., Bernad, A., Hubbard, A., Cadenas, S., and Melov, S. (2009). Increase in mitochondrial biogenesis, oxidative stress, and glycolysis in murine lymphomas. *Free radical biology & medicine* 46, 387-396.

- Sanchez, T., Estrada-Hernandez, T., Paik, J.H., Wu, M.T., Venkataraman, K., Brinkmann, V., Claffey, K., and Hla, T. (2003). Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability. *J Biol Chem* 278, 47281-47290.
- Sanchez, T., Skoura, A., Wu, M.T., Casserly, B., Harrington, E.O., and Hla, T. (2007). Induction of vascular permeability by the sphingosine-1-phosphate receptor-2 (S1P2R) and its downstream effectors ROCK and PTEN. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 1312-1318.
- Sankala, H.M., Hait, N.C., Paugh, S.W., Shida, D., Lepine, S., Elmore, L.W., Dent, P., Milstien, S., and Spiegel, S. (2007). Involvement of sphingosine kinase 2 in p53-independent induction of p21 by the chemotherapeutic drug doxorubicin. *Cancer Res* 67, 10466-10474.
- Sanna, M.G., Wang, S.K., Gonzalez-Cabrera, P.J., Don, A., Marsolais, D., Matheu, M.P., Wei, S.H., Parker, I., Jo, E., Cheng, W.C., *et al.* (2006). Enhancement of capillary leakage and restoration of lymphocyte egress by a chiral S1P1 antagonist in vivo. *Nature chemical biology* 2, 434-441.
- Santaguida, S., Tighe, A., D'Alise, A.M., Taylor, S.S., and Musacchio, A. (2010). Dissecting the role of MPS1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibitor reversine. *J Cell Biol* 190, 73-87.
- Sato, K., Malchinkhuu, E., Horiuchi, Y., Mogi, C., Tomura, H., Tosaka, M., Yoshimoto, Y., Kuwabara, A., and Okajima, F. (2007). Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes. *J Neurochem* 103, 2610-2619.
- Sauer, L., Nunes, J., Salunkhe, V., Skalska, L., Kohama, T., Cuvillier, O., Waxman, J., and Pchejetski, D. (2009). Sphingosine kinase 1 inhibition sensitizes hormone-resistant prostate cancer to docetaxel. *Int J Cancer* 125, 2728-2736.
- Saurin, A.T., van der Waal, M.S., Medema, R.H., Lens, S.M., and Kops, G.J. (2011). Aurora B potentiates Mps1 activation to ensure rapid checkpoint establishment at the onset of mitosis. *Nature communications* 2, 316.
- Schmidt, J.C., Arthanari, H., Boeszoermenyi, A., Dashkevich, N.M., Wilson-Kubalek, E.M., Monnier, N., Markus, M., Oberer, M., Milligan, R.A., Bathe, M., *et al.* (2012). The kinetochore-bound Ska1 complex tracks depolymerizing microtubules and binds to curved protofilaments. *Dev Cell* 23, 968-980.
- Schnitzer, S.E., Weigert, A., Zhou, J., and Brune, 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.
- Schnute, M.E., McReynolds, M.D., Kasten, T., Yates, M., Jerome, G., Rains, J.W., Hall, T., Chrencik, J., Kraus, M., Cronin, C.N., *et al.* (2012). Modulation of cellular S1P levels with a novel, potent and specific inhibitor of sphingosine kinase-1. *Biochem J*.
- Scholey, J.M., Brust-Mascher, I., and Mogilner, A. (2003). Cell division. *Nature* 422, 746-752.
- Schulze, T., Golfier, S., Tabeling, C., Rabel, K., Graler, M.H., Witzernath, M., and Lipp, M. (2011). Sphingosine-1-phosphate receptor 4 (S1P4) deficiency profoundly affects dendritic cell function and TH17-cell differentiation in a murine model. *Faseb J* 25, 4024-4036.
- Schwab, S.R., Pereira, J.P., Matloubian, M., Xu, Y., Huang, Y., and Cyster, J.G. (2005). Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science* 309, 1735-1739.
- Schwalm, S., Doll, F., Romer, 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.

- Screpanti, E., De Antoni, A., Alushin, G.M., Petrovic, A., Melis, T., Nogales, E., and Musacchio, A. (2011). Direct binding of Cenp-C to the Mis12 complex joins the inner and outer kinetochore. *Curr Biol* 21, 391-398.
- Serriere-Lanneau, V., Teixeira-Clerc, F., Li, L., Schippers, M., de Wries, W., Julien, B., Tran-Van-Nhieu, J., Manin, S., Poelstra, K., Chun, J., *et al.* (2007). The sphingosine 1-phosphate receptor S1P2 triggers hepatic wound healing. *Faseb J* 21, 2005-2013.
- Sethu, S., Mendez-Corao, G., and Melendez, A.J. (2008). Phospholipase D1 plays a key role in TNF-alpha signaling. *J Immunol* 180, 6027-6034.
- Shepherd, L.A., Meadows, J.C., Sochaj, A.M., Lancaster, T.C., Zou, J., Buttrick, G.J., Rappsilber, J., Hardwick, K.G., and Millar, J.B. (2012). Phosphodependent recruitment of Bub1 and Bub3 to Spc7/KNL1 by Mph1 kinase maintains the spindle checkpoint. *Curr Biol* 22, 891-899.
- Shida, D., Fang, X., Kordula, T., Takabe, K., Lepine, S., Alvarez, S.E., Milstien, S., and Spiegel, S. (2008). Cross-talk between LPA1 and epidermal growth factor receptors mediates up-regulation of sphingosine kinase 1 to promote gastric cancer cell motility and invasion. *Cancer Res* 68, 6569-6577.
- Shida, D., Kitayama, J., Yamaguchi, H., Yamashita, H., Mori, K., Watanabe, T., Yatomi, Y., and Nagawa, H. (2004). Sphingosine 1-phosphate transactivates c-Met as well as epidermal growth factor receptor (EGFR) in human gastric cancer cells. *FEBS Lett* 577, 333-338.
- Shin, H.J., Baek, K.H., Jeon, A.H., Park, M.T., Lee, S.J., Kang, C.M., Lee, H.S., Yoo, S.H., Chung, D.H., Sung, Y.C., *et al.* (2003). Dual roles of human BubR1, a mitotic checkpoint kinase, in the monitoring of chromosomal instability. *Cancer Cell* 4, 483-497.
- Shu, X., Wu, W., Mosteller, R.D., and Broek, D. (2002). Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* 22, 7758-7768.
- Silio, V., Redondo-Munoz, J., and Carrera, A.C. (2012). Phosphoinositide 3-kinase beta regulates chromosome segregation in mitosis. *Mol Biol Cell* 23, 4526-4542.
- Silk, A.D., Zasadil, L.M., Holland, A.J., Vitre, B., Cleveland, D.W., and Weaver, B.A. (2013). Chromosome missegregation rate predicts whether aneuploidy will promote or suppress tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E4134-4141.
- Siow, D., and Wattenberg, B. (2011). The compartmentalization and translocation of the sphingosine kinases: mechanisms and functions in cell signaling and sphingolipid metabolism. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 46, 365-375.
- Siow, D.L., Anderson, C.D., Berdyshev, E.V., Skobeleva, A., Pitson, S.M., and Wattenberg, B.W. (2010). Intracellular localization of sphingosine kinase 1 alters access to substrate pools but does not affect the degradative fate of sphingosine-1-phosphate. *J Lipid Res* 51, 2546-2559.
- Skoura, A., Michaud, J., Im, D.S., Thangada, S., Xiong, Y., Smith, J.D., and Hla, T. (2011). Sphingosine-1-phosphate receptor-2 function in myeloid cells regulates vascular inflammation and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31, 81-85.
- Skoura, A., Sanchez, T., Claffey, K., Mandala, S.M., Proia, R.L., and Hla, T. (2007). Essential role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in pathological angiogenesis of the mouse retina. *J Clin Invest* 117, 2506-2516.
- Snider, A.J., Orr Gandy, K.A., and Obeid, L.M. (2010). Sphingosine kinase: Role in regulation of bioactive sphingolipid mediators in inflammation. *Biochimie* 92, 707-715.

- Sobue, S., Nemoto, S., Murakami, M., Ito, H., Kimura, A., Gao, S., Furuhata, A., Takagi, A., Kojima, T., Nakamura, M., *et al.* (2008). Implications of sphingosine kinase 1 expression level for the cellular sphingolipid rheostat: relevance as a marker for daunorubicin sensitivity of leukemia cells. *International journal of hematology* 87, 266-275.
- Song, L., Xiong, H., Li, J., Liao, W., Wang, L., Wu, J., and Li, M. (2011). Sphingosine kinase-1 enhances resistance to apoptosis through activation of PI3K/Akt/NF-kappaB pathway in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 17, 1839-1849.
- Soussi, T. (2007). p53 alterations in human cancer: more questions than answers. *Oncogene* 26, 2145-2156.
- Soussi, T., and Wiman, K.G. (2007). Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer Cell* 12, 303-312.
- Spiegel, S., and Merrill, A.H., Jr. (1996). Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *Faseb J* 10, 1388-1397.
- 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. (2011). The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nature reviews Immunology* 11, 403-415.
- Stahelin, R.V., Hwang, J.H., Kim, J.H., Park, Z.Y., Johnson, K.R., Obeid, L.M., and Cho, W. (2005). The mechanism of membrane targeting of human sphingosine kinase 1. *J Biol Chem* 280, 43030-43038.
- Stewart, Z.A., Mays, D., and Pietsenpol, J.A. (1999). Defective G1-S cell cycle checkpoint function sensitizes cells to microtubule inhibitor-induced apoptosis. *Cancer Res* 59, 3831-3837.
- Stoffel, W., Heimann, G., and Hellenbroich, B. (1973). Sphingosine kinase in blood platelets. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie* 354, 562-566.
- Stolz, A., Vogel, C., Schneider, V., Ertych, N., Kienitz, A., Yu, H., and Bastians, H. (2009). Pharmacologic abrogation of the mitotic spindle checkpoint by an indolocarbazole discovered by cellular screening efficiently kills cancer cells. *Cancer Res* 69, 3874-3883.
- Strausfeld, U., Labbe, J.C., Fesquet, D., Cavadore, J.C., Picard, A., Sadhu, K., Russell, P., and Doree, M. (1991). Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature* 351, 242-245.
- Strub, G.M., Maceyka, M., Hait, N.C., Milstien, S., and Spiegel, S. (2010). Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Adv Exp Med Biol* 688, 141-155.
- Strub, G.M., Paillard, M., Liang, J., Gomez, L., Allegood, J.C., Hait, N.C., Maceyka, M., Price, M.M., Chen, Q., Simpson, D.C., *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.
- Sudakin, V., Chan, G.K., and Yen, T.J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* 154, 925-936.
- Sugiura, M., Kono, K., Liu, H., Shimizugawa, T., Minekura, H., Spiegel, S., and Kohama, T. (2002). Ceramide kinase, a novel lipid kinase. Molecular cloning and functional characterization. *J Biol Chem* 277, 23294-23300.

- Suijkerbuijk, S.J., Vleugel, M., Teixeira, A., and Kops, G.J. (2012). Integration of kinase and phosphatase activities by BUBR1 ensures formation of stable kinetochore-microtubule attachments. *Dev Cell* 23, 745-755.
- Sukocheva, O., Wadham, C., Holmes, A., Albanese, N., Verrier, E., Feng, F., Bernal, A., Derian, C.K., Ullrich, A., Vadas, M.A., *et al.* (2006). Estrogen transactivates EGFR via the sphingosine 1-phosphate receptor Edg-3: the role of sphingosine kinase-1. *J Cell Biol* 173, 301-310.
- Sukocheva, O., Wang, L., Verrier, E., Vadas, M.A., and Xia, P. (2009). Restoring endocrine response in breast cancer cells by inhibition of the sphingosine kinase-1 signaling pathway. *Endocrinology* 150, 4484-4492.
- Sukocheva, O.A., Wang, L., Albanese, N., Pitson, S.M., Vadas, M.A., and Xia, P. (2003). Sphingosine kinase transmits estrogen signaling in human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 17, 2002-2012.
- Summers, S.A. (2010). Sphingolipids and insulin resistance: the five Ws. *Current opinion in lipidology* 21, 128-135.
- Sutherland, C.M., Moretti, P.A., Hewitt, N.M., Bagley, C.J., Vadas, M.A., and Pitson, S.M. (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.
- Sutphen, R., Xu, Y., Wilbanks, G.D., Fiorica, J., Grendys, E.C., Jr., LaPolla, J.P., Arango, H., Hoffman, M.S., Martino, M., Wakeley, K., *et al.* (2004). Lysophospholipids are potential biomarkers of ovarian cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 13, 1185-1191.
- Swanton, C., Nicke, B., Schuett, M., Eklund, A.C., Ng, C., Li, Q., Hardcastle, T., Lee, A., Roy, R., East, P., *et al.* (2009). Chromosomal instability determines taxane response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8671-8676.
- Taha, T.A., Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2006). Sphingosine kinase: biochemical and cellular regulation and role in disease. *Journal of biochemistry and molecular biology* 39, 113-131.
- Taha, T.A., Osta, W., Kozhaya, L., Bielawski, J., Johnson, K.R., Gillanders, W.E., Dbaiibo, G.S., Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2004). Down-regulation of sphingosine kinase-1 by DNA damage: dependence on proteases and p53. *J Biol Chem* 279, 20546-20554.
- Takabe, K., Kim, R.H., Allegood, J.C., Mitra, P., Ramachandran, S., Nagahashi, M., Harikumar, K.B., Hait, N.C., Milstien, S., and Spiegel, S. (2010). Estradiol induces export of sphingosine 1-phosphate from breast cancer cells via ABCC1 and ABCG2. *J Biol Chem* 285, 10477-10486.
- Takada, K., Wang, X., Hart, G.T., Odumade, O.A., Weinreich, M.A., Hogquist, K.A., and Jameson, S.C. (2011). Kruppel-like factor 2 is required for trafficking but not quiescence in postactivated T cells. *J Immunol* 186, 775-783.
- Takasugi, N., Sasaki, T., Suzuki, K., Osawa, S., Isshiki, H., Hori, Y., Shimada, N., Higo, T., Yokoshima, S., Fukuyama, T., *et al.* (2011). BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate. *J Neurosci* 31, 6850-6857.
- Takenaka, K., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1997). MAP kinase is required for the spindle assembly checkpoint but is dispensable for the normal M phase entry and exit in *Xenopus* egg cell cycle extracts. *J Cell Biol* 136, 1091-1097.
- Tani, M., Ito, M., and Igarashi, Y. (2007). Ceramide/sphingosine/sphingosine 1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space. *Cell Signal* 19, 229-237.

- Taniguchi, K., Ishizaki, T., Ayada, T., Sugiyama, Y., Wakabayashi, Y., Sekiya, T., Nakagawa, R., and Yoshimura, A. (2009). Sprouty4 deficiency potentiates Ras-independent angiogenic signals and tumor growth. *Cancer Sci* 100, 1648-1654.
- Tao, W., South, V.J., Zhang, Y., Davide, J.P., Farrell, L., Kohl, N.E., Sepp-Lorenzino, L., and Lobell, R.B. (2005). Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage. *Cancer Cell* 8, 49-59.
- Taylor, S.S., Scott, M.I., and Holland, A.J. (2004). The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation. *Chromosome Res* 12, 599-616.
- Teichner, A., Eytan, E., Sitry-Shevah, D., Miniowitz-Shemtov, S., Dumin, E., Gromis, J., and Hershko, A. (2011). p31^{comet} Promotes disassembly of the mitotic checkpoint complex in an ATP-dependent process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3187-3192.
- Thompson, C.R., Iyer, S.S., Melrose, N., VanOosten, R., Johnson, K., Pitson, S.M., Obeid, L.M., and Kusner, D.J. (2005). Sphingosine kinase 1 (SK1) is recruited to nascent phagosomes in human macrophages: inhibition of SK1 translocation by Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* 174, 3551-3561.
- Thudichum, J.L.W. (1884). *A Treatise on the Chemical Constitution of the Brain*. London, Bailliere, Tindall, and Cox.
- Tien, J.F., Umbreit, N.T., Gestaut, D.R., Franck, A.D., Cooper, J., Wordeman, L., Gonen, T., Asbury, C.L., and Davis, T.N. (2010). Cooperation of the Dam1 and Ndc80 kinetochore complexes enhances microtubule coupling and is regulated by aurora B. *J Cell Biol* 189, 713-723.
- Ubai, T., Azuma, H., Kotake, Y., Inamoto, T., Takahara, K., Ito, Y., Kiyama, S., Sakamoto, T., Horie, S., Muto, S., *et al.* (2007). FTY720 induced Bcl-associated and Fas-independent apoptosis in human renal cancer cells in vitro and significantly reduced in vivo tumor growth in mouse xenograft. *Anticancer research* 27, 75-88.
- Uchida, K.S., Takagaki, K., Kumada, K., Hirayama, Y., Noda, T., and Hirota, T. (2009). Kinetochore stretching inactivates the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* 184, 383-390.
- Uzunova, K., Dye, B.T., Schutz, H., Ladurner, R., Petzold, G., Toyoda, Y., Jarvis, M.A., Brown, N.G., Poser, I., Novatchkova, M., *et al.* (2012). APC15 mediates CDC20 autoubiquitylation by APC/C(MCC) and disassembly of the mitotic checkpoint complex. *Nature structural & molecular biology* 19, 1116-1123.
- 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.
- Vader, G., Kauw, J.J., Medema, R.H., and Lens, S.M. (2006). Survivin mediates targeting of the chromosomal passenger complex to the centromere and midbody. *EMBO reports* 7, 85-92.
- Van Brocklyn, J.R., Graler, M.H., Bernhardt, G., Hobson, J.P., Lipp, M., and Spiegel, S. (2000). Sphingosine-1-phosphate is a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-6. *Blood* 95, 2624-2629.
- Van Brocklyn, J.R., Jackson, C.A., Pearl, D.K., Kotur, M.S., Snyder, P.J., and Prior, T.W. (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 der Waal, M.S., Saurin, A.T., Vromans, M.J., Vleugel, M., Wurzenberger, C., Gerlich, D.W., Medema, R.H., Kops, G.J., and Lens, S.M. (2012). Mps1 promotes rapid centromere accumulation of Aurora B. *EMBO reports* 13, 847-854.

- van Doorn, R., Lopes Pinheiro, M.A., Kooij, G., Lakeman, K., van het Hof, B., van der Pol, S.M., Geerts, D., van Horssen, J., van der Valk, P., van der Kam, E., *et al.* (2012). Sphingosine 1-phosphate receptor 5 mediates the immune quiescence of the human brain endothelial barrier. *Journal of neuroinflammation* 9, 133.
- van Koppen, C.J., Meyer zu Heringdorf, D., Alemany, R., and Jakobs, K.H. (2001). Sphingosine kinase-mediated calcium signaling by muscarinic acetylcholine receptors. *Life Sci* 68, 2535-2540.
- van Meeteren, L.A., Brinkmann, V., Saulnier-Blache, J.S., Lynch, K.R., and Moolenaar, W.H. (2008). Anticancer activity of FTY720: phosphorylated FTY720 inhibits autotaxin, a metastasis-enhancing and angiogenic lysophospholipase D. *Cancer Lett* 266, 203-208.
- Vanoosthuysse, V., and Hardwick, K.G. (2009). A novel protein phosphatase 1-dependent spindle checkpoint silencing mechanism. *Curr Biol* 19, 1176-1181.
- Vanoosthuysse, V., Valsdottir, R., Javerzat, J.P., and Hardwick, K.G. (2004). Kinetochores targeting of fission yeast Mad and Bub proteins is essential for spindle checkpoint function but not for all chromosome segregation roles of Bub1p. *Mol Cell Biol* 24, 9786-9801.
- Varetti, G., Guida, C., Santaguida, S., Chirolì, E., and Musacchio, A. (2011). Homeostatic control of mitotic arrest. *Molecular cell* 44, 710-720.
- Vassilev, L.T., Tovar, C., Chen, S., Knezevic, D., Zhao, X., Sun, H., Heimbrook, D.C., and Chen, L. (2006). Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10660-10665.
- Venkataraman, K., Lee, Y.M., Michaud, J., Thangada, S., Ai, Y., Bonkovsky, H.L., Parikh, N.S., Habrukowich, C., and Hla, T. (2008). Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circ Res* 102, 669-676.
- Venkataraman, K., Thangada, S., Michaud, J., Oo, M.L., Ai, Y., Lee, Y.M., Wu, M., Parikh, N.S., Khan, F., Proia, R.L., *et al.* (2006). Extracellular export of sphingosine kinase-1a contributes to the vascular S1P gradient. *Biochem J* 397, 461-471.
- Vessey, D.A., Kelley, M., Zhang, J., Li, L., Tao, R., and Karliner, J.S. (2007). Dimethylsphingosine and FTY720 inhibit the SK1 form but activate the SK2 form of sphingosine kinase from rat heart. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 21, 273-279.
- Vigneron, S., Prieto, S., Bernis, C., Labbe, J.C., Castro, A., and Lorca, T. (2004). Kinetochores localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom? *Mol Biol Cell* 15, 4584-4596.
- Visentin, B., Vekich, J.A., Sibbald, B.J., Cavalli, A.L., Moreno, K.M., Matteo, R.G., Garland, W.A., Lu, Y., Yu, S., Hall, H.S., *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.
- Vitre, B.D., and Cleveland, D.W. (2012). Centrosomes, chromosome instability (CIN) and aneuploidy. *Current opinion in cell biology* 24, 809-815.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
- von Hansemann, D. (1890). Ueber asymmetrische Zelltheilung in epithel Krebsen und deren biologische Bedeutung. *Virchow's Arch Path Anat* 119.
- Wacker, B.K., Park, T.S., and Gidday, J.M. (2009). Hypoxic preconditioning-induced cerebral ischemic tolerance: role of microvascular sphingosine kinase 2. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 40, 3342-3348.

- Walzer, T., Chiossone, L., Chaix, J., Calver, A., Carozzo, C., Garrigue-Antar, L., Jacques, Y., Baratin, M., Tomasello, E., and Vivier, E. (2007). Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nature immunology* 8, 1337-1344.
- Wang, D., Zhao, Z., Caperell-Grant, A., Yang, G., Mok, S.C., Liu, J., Bigsby, R.M., and Xu, Y. (2008). S1P differentially regulates migration of human ovarian cancer and human ovarian surface epithelial cells. *Mol Cancer Ther* 7, 1993-2002.
- Wang, F., Dai, J., Daum, J.R., Niedzialkowska, E., Banerjee, B., Stukenberg, P.T., Gorbsky, G.J., and Higgins, J.M. (2010a). Histone H3 Thr-3 phosphorylation by Haspin positions Aurora B at centromeres in mitosis. *Science* 330, 231-235.
- Wang, F., Okamoto, Y., Inoki, I., Yoshioka, K., Du, W., Qi, X., Takuwa, N., Gonda, K., Yamamoto, Y., Ohkawa, R., *et al.* (2010b). Sphingosine-1-phosphate receptor-2 deficiency leads to inhibition of macrophage proinflammatory activities and atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 120, 3979-3995.
- Wang, F., Van Brocklyn, J.R., Edsall, L., Nava, V.E., and Spiegel, S. (1999a). Sphingosine-1-phosphate inhibits motility of human breast cancer cells independently of cell surface receptors. *Cancer Res* 59, 6185-6191.
- Wang, J.D., Takahara, S., Nonomura, N., Ichimaru, N., Toki, K., Azuma, H., Matsumiya, K., Okuyama, A., and Suzuki, S. (1999b). Early induction of apoptosis in androgen-independent prostate cancer cell line by FTY720 requires caspase-3 activation. *The Prostate* 40, 50-55.
- Wang, L., Xing, X.P., Holmes, A., Wadham, C., Gamble, J.R., Vadas, M.A., and Xia, P. (2005a). Activation of the sphingosine kinase-signaling pathway by high glucose mediates the proinflammatory phenotype of endothelial cells. *Circ Res* 97, 891-899.
- Wang, W., Graeler, M.H., and Goetzl, E.J. (2005b). 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.
- Wang, Z., Min, X., Xiao, S.H., Johnstone, S., Romanow, W., Meininger, D., Xu, H., Liu, J., Dai, J., An, S., *et al.* (2013). Molecular basis of sphingosine kinase 1 substrate recognition and catalysis. *Structure* 21, 798-809.
- Warren, C.D., Brady, D.M., Johnston, R.C., Hanna, J.S., Hardwick, K.G., and Spencer, F.A. (2002). Distinct chromosome segregation roles for spindle checkpoint proteins. *Mol Biol Cell* 13, 3029-3041.
- Waters, C., Sambhi, B., Kong, K.C., Thompson, D., Pitson, S.M., Pyne, S., and Pyne, N.J. (2003). Sphingosine 1-phosphate and platelet-derived growth factor (PDGF) act via PDGF beta receptor-sphingosine 1-phosphate receptor complexes in airway smooth muscle cells. *J Biol Chem* 278, 6282-6290.
- Wattenberg, B.W. (2010). Role of sphingosine kinase localization in sphingolipid signaling. *World J Biol Chem* 1, 362-368.
- Weaver, B.A., Bonday, Z.Q., Putkey, F.R., Kops, G.J., Silk, A.D., and Cleveland, D.W. (2003). Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *J Cell Biol* 162, 551-563.
- Weaver, B.A., Silk, A.D., Montagna, C., Verdier-Pinard, P., and Cleveland, D.W. (2007). Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor. *Cancer Cell* 11, 25-36.
- Weigert, A., Cremer, S., Schmidt, M.V., von Knethen, A., Angioni, C., Geisslinger, G., and Brune, B. (2010). Cleavage of sphingosine kinase 2 by caspase-1 provokes its release from apoptotic cells. *Blood* 115, 3531-3540.

- Weigert, A., Schiffmann, S., Sekar, D., Ley, S., Menrad, H., Werno, C., Grosch, S., Geisslinger, G., and Brune, B. (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.
- Weisz, L., Oren, M., and Rotter, V. (2007). Transcription regulation by mutant p53. *Oncogene* *26*, 2202-2211.
- Welburn, J.P., Vleugel, M., Liu, D., Yates, J.R., 3rd, Lampson, M.A., Fukagawa, T., and Cheeseman, I.M. (2010). Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface. *Molecular cell* *38*, 383-392.
- Westhorpe, F.G., Tighe, A., Lara-Gonzalez, P., and Taylor, S.S. (2011). p31^{comet}-mediated extraction of Mad2 from the MCC promotes efficient mitotic exit. *J Cell Sci* *124*, 3905-3916.
- Windh, R.T., Lee, M.J., Hla, T., An, S., Barr, A.J., and Manning, D.R. (1999). Differential coupling of the sphingosine 1-phosphate receptors Edg-1, Edg-3, and H218/Edg-5 to the G(i), G(q), and G(12) families of heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* *274*, 27351-27358.
- Wojcik, E., Basto, R., Serr, M., Scaerou, F., Karess, R., and Hays, T. (2001). Kinetochore dynein: its dynamics and role in the transport of the Rough deal checkpoint protein. *Nat Cell Biol* *3*, 1001-1007.
- Wright, J.H., Munar, E., Jameson, D.R., Andreassen, P.R., Margolis, R.L., Seger, R., and Krebs, E.G. (1999). Mitogen-activated protein kinase kinase activity is required for the G(2)/M transition of the cell cycle in mammalian fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 11335-11340.
- Wu, W., Mosteller, R.D., and Broek, D. (2004). Sphingosine kinase protects lipopolysaccharide-activated macrophages from apoptosis. *Mol Cell Biol* *24*, 7359-7369.
- Xia, G., Luo, X., Habu, T., Rizo, J., Matsumoto, T., and Yu, H. (2004). Conformation-specific binding of p31^{comet} antagonizes the function of Mad2 in the spindle checkpoint. *The EMBO journal* *23*, 3133-3143.
- Xia, J., Wu, Z., Yu, C., He, W., Zheng, H., He, Y., Jian, W., Chen, L., Zhang, L., and Li, W. (2012). miR-124 inhibits cell proliferation in gastric cancer through down-regulation of SPHK1. *The Journal of pathology* *227*, 470-480.
- Xia, P., Gamble, J.R., Rye, K.A., Wang, L., Hii, C.S., Cockerill, P., Khew-Goodall, Y., Bert, A.G., Barter, P.J., and Vadas, M.A. (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, J.R., Wang, L., Pitson, S.M., Moretti, P.A., Wattenberg, B.W., D'Andrea, R.J., and Vadas, M.A. (2000). An oncogenic role of sphingosine kinase. *Curr Biol* *10*, 1527-1530.
- Xia, P., Wang, L., Moretti, P.A., Albanese, N., Chai, F., Pitson, S.M., D'Andrea, R.J., Gamble, J.R., and Vadas, M.A. (2002). Sphingosine kinase interacts with TRAF2 and dissects tumor necrosis factor-alpha signaling. *J Biol Chem* *277*, 7996-8003.
- Xu, Y., Xiao, Y.J., Baudhuin, L.M., and Schwartz, B.M. (2001). The role and clinical applications of bioactive lysolipids in ovarian cancer. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* *8*, 1-13.
- Xu, Z., Ogawa, H., Vagnarelli, P., Bergmann, J.H., Hudson, D.F., Ruchaud, S., Fukagawa, T., Earnshaw, W.C., and Samejima, K. (2009). INCENP-aurora B interactions modulate kinase activity and chromosome passenger complex localization. *J Cell Biol* *187*, 637-653.
- Yamagishi, Y., Honda, T., Tanno, Y., and Watanabe, Y. (2010). Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation. *Science* *330*, 239-243.

- Yamagishi, Y., Yang, C.H., Tanno, Y., and Watanabe, Y. (2012). MPS1/Mph1 phosphorylates the kinetochore protein KNL1/Spc7 to recruit SAC components. *Nat Cell Biol* 14, 746-752.
- Yamaguchi, F., Tokuda, M., Hatase, O., and Brenner, S. (1996). Molecular cloning of the novel human G protein-coupled receptor (GPCR) gene mapped on chromosome 9. *Biochem Biophys Res Commun* 227, 608-614.
- Yamamura, S., Hakomori, S., Wada, A., and Igarashi, Y. (2000). Sphingosine-1-phosphate inhibits haptotactic motility by overproduction of focal adhesion sites in B16 melanoma cells through EDG-induced activation of Rho. *Ann N Y Acad Sci* 905, 301-307.
- Yamashita, H., Kitayama, J., Shida, D., Yamaguchi, H., Mori, K., Osada, M., Aoki, S., Yatomi, Y., Takuwa, Y., and Nagawa, H. (2006). Sphingosine 1-phosphate receptor expression profile in human gastric cancer cells: differential regulation on the migration and proliferation. *The Journal of surgical research* 130, 80-87.
- Yamazaki, Y., Kon, J., Sato, K., Tomura, H., Sato, M., Yoneya, T., Okazaki, H., Okajima, F., and Ohta, H. (2000). Edg-6 as a putative sphingosine 1-phosphate receptor coupling to Ca(2+) signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 268, 583-589.
- Yatomi, Y., Ruan, F., Megidish, T., Toyokuni, T., Hakomori, S., and Igarashi, Y. (1996). N,N-dimethylsphingosine inhibition of sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate activity in human platelets. *Biochemistry* 35, 626-633.
- Yokota, S., Taniguchi, Y., Kihara, A., Mitsutake, S., and Igarashi, Y. (2004). Asp177 in C4 domain of mouse sphingosine kinase 1a is important for the sphingosine recognition. *FEBS Lett* 578, 106-110.
- Yoshida, Y., Nakada, M., Harada, T., Tanaka, S., Furuta, T., Hayashi, Y., Kita, D., Uchiyama, N., Hayashi, Y., and Hamada, J. (2010a). The expression level of sphingosine-1-phosphate receptor type 1 is related to MIB-1 labeling index and predicts survival of glioblastoma patients. *Journal of neuro-oncology* 98, 41-47.
- Yoshida, Y., Nakada, M., Sugimoto, N., Harada, T., Hayashi, Y., Kita, D., Uchiyama, N., Hayashi, Y., Yachie, A., Takuwa, Y., *et al.* (2010b). Sphingosine-1-phosphate receptor type 1 regulates glioma cell proliferation and correlates with patient survival. *Int J Cancer* 126, 2341-2352.
- Young, K.W., Challiss, R.A., Nahorski, S.R., and MacKrell, J.J. (1999). Lysophosphatidic acid-mediated Ca²⁺ mobilization in human SH-SY5Y neuroblastoma cells is independent of phosphoinositide signalling, but dependent on sphingosine kinase activation. *Biochem J* 343 Pt 1, 45-52.
- Young, N., and Van Brocklyn, J.R. (2007). Roles of sphingosine-1-phosphate (S1P) receptors in malignant behavior of glioma cells. Differential effects of S1P2 on cell migration and invasiveness. *Exp Cell Res* 313, 1615-1627.
- Yu, H., Chen, J.K., Feng, S., Dalgarno, D.C., Brauer, A.W., and Schreiber, S.L. (1994). Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* 76, 933-945.
- Zirkle, R.E. (1970). Ultraviolet-microbeam irradiation of newt-cell cytoplasm: spindle destruction, false anaphase, and delay of true anaphase. *Radiat Res* 41, 516-537.
- Zondag, G.C., Postma, F.R., Etten, I.V., Verlaan, I., and Moolenaar, W.H. (1998). Sphingosine 1-phosphate signalling through the G-protein-coupled receptor Edg-1. *Biochem J* 330 (Pt 2), 605-609.

ANNEXE

1. Macro Image J développée pour l'analyse de la localisation kinétochorienne de Mad2 et de BuBR1

```
/*
GA 2013 Macro pour quantifier la fluorescence d'une ROI corrigée par le background
Version 1.0
*/

run("Clear Results");

/*
Pour demander le répertoire où enregistrer les données :
+ où ouvrir les images
+ boucle pour ouvrir chaque image
*/

fichier=getDirectory("Where are the files ?") ;
listImages=getFileList(fichier) ;

for (n=0; n< listImages.length; n++){
while (nImages>0) {
    selectImage(nImages);
    close();
}
    open(fichier+ listImages[n]);

//Définir le nom du signal à analyser

var c1Signal = "DAPI";
var c2Signal = "signal";
var c3Signal = "CREST";
var chosenSignal;

rename("stack");
run("Split Channels");
selectWindow("C1-stack");
run("Z Project...", "projection=[Sum Slices]");
selectWindow("C2-stack");
run("Z Project...", "projection=[Sum Slices]");
selectWindow("C3-stack");
run("Z Project...", "projection=[Sum Slices]");

    Dialog.create("Channel 1");
    Dialog.addMessage("Enter the name of the signal in C1");
    Dialog.addString("Signal:", c1Signal, 12);
    Dialog.show();
    c1Signal = Dialog.getString();

    c2Choice = newArray("Aurora B pThr232", "Aurora B", "Mad2", "BubR1");
    Dialog.create("Channel 2");
    Dialog.addChoice("Signal:", c2Choice);
    Dialog.show();
    c2Signal = Dialog.getChoice();
```

```

        Dialog.create("Channel 3");
        Dialog.addMessage("Enter the name of the signal in C3");
        Dialog.addString("Signal:", c3Signal, 12);
        Dialog.show();
        c3Signal = Dialog.getString();

selectWindow("SUM_C1-stack");
close;
selectWindow("SUM_C2-stack");
close;
selectWindow("SUM_C3-stack");
close;

// Sélection du canal à analyser, Projection en z
channelChoice = newArray(c1Signal, c2Signal, c3Signal);
    Dialog.create("Chosen Signal");
        Dialog.addChoice("Enter the name of the signal to analyze", channelChoice);
        Dialog.show();
        chosenSignal = Dialog.getChoice();

selectWindow("C1-stack");
rename(c1Signal);

selectWindow("C2-stack");
rename(c2Signal);

selectWindow("C3-stack");
rename(c3Signal);

//WaitForUser sélectionner les plans et faire manuellement les z stacks

waitForUser( "Z projection", "Select the planes and do the z projections.\nPress OK when you are
done.");

selectWindow(c1Signal);
close();
selectWindow(c2Signal);
close();
selectWindow(c3Signal);
close();

// Calcul de l'intensité des Kinétochores

// Déclaration variables

var backIntDen1;
var backIntDen2;
var backIntDen3;
var intBackground;

var intKt;
var areaKt;

```

```

var correctedIntKt;
var result;

var nombreKts;

var counter=1;
var numeroLigne=0;
var numeroLigneResult=0;

// Sélectionner des zones de background

setTool("rectangle");
makeRectangle(93, 72, 7, 7);
waitForUser( "Background ", "Add to the ROI Manager 3 background \n\nrectangular zones (same
size).\n\nPress OK when you are done.");
    roiManager("Select", 0);
    roiManager("Measure");
    roiManager("Select", 1);
    roiManager("Measure");
    roiManager("Select", 2);
    roiManager("Measure");

    backIntDen1=getResult("IntDen",0);
    backIntDen2=getResult("IntDen",1);
    backIntDen3=getResult("IntDen",2);
    intBackground=(backIntDen1+backIntDen2+backIntDen3)/3;

// Définition des ROI
roiManager("Select", 0);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Delete");
run("Clear Results");

setTool("polygon");
waitForUser( "Kinetochores ", "Add the ROI to the ROI Manager.\n\nPress OK when you are done.");

// Déclaration de la fonction measureIntensityKt

function measureIntensityKt (numeroLigne, intKt, areaKt, intBackground, correctedIntKt)

{
    roiManager("Select", numeroLigne);
    roiManager("Measure");

    intKt=getResult("IntDen", numeroLigne);
    areaKt=getResult("Area", numeroLigne);

    correctedIntKt = intKt - (areaKt * intBackground);

    return correctedIntKt;
}

```

```

// Déclaration de la fonction measureIntensitySignal

function measureIntensitySignal (numeroLigne2, intSignal, areaSignal, intBackgroundSignal,
correctedIntSignal)

{
    roiManager("Select", numeroLigne2);
    roiManager("Measure");

    intSignal=getResult("IntDen", numeroLigne2);
    areaSignal=getResult("Area", numeroLigne2);

    correctedIntSignal = intSignal - (areaSignal * intBackgroundSignal);

    return correctedIntSignal;
}

// Définir le nombre de kinétochores

Dialog.create("Kts number");
    Dialog.addMessage("How many Kts to analyze ?");
    Dialog.addString("n=", nombreKts);
    Dialog.show();
    nombreKts = Dialog.getString();

// Déclaration de la boucle

while (counter<=nombreKts)
{
    result = measureIntensityKt (numeroLigne, intKt, areaKt, intBackground, correctedIntKt);
    setResult("Kt Intensity", numeroLigneResult, result);
    numeroLigneResult++;
    numeroLigne++;
    counter++;
}

saveAs("Measurements", fichier+ listelimages[n]+"-Resultats IntDen Kinetochore.xls");

// Calcul de l'intensité du Signal

// Déclaration variables

var backIntDenSignal1;
var backIntDenSignal2;
var backIntDenSignal3;
var intBackgroundSignal;

var intSignal;
var areaSignal;
var correctedIntSignal;
var resultSignal;

var numeroLigne2=0;
var counter2=1;

```

```

var numeroLigneResult2=0;

// Sélectionner des zones de background

selectWindow("SUM_"+chosenSignal);

run("Clear Results");
setTool("rectangle");
makeRectangle(93, 72, 7, 7);
waitForUser( "Background ", "Add to the ROI Manager 3 background \n\nrectangular zones (same
size).\n\nSelect and press OK when you are done.");

    roiManager("Measure");

    backIntDenSignal1=getResult("IntDen",0);
    backIntDenSignal2=getResult("IntDen",1);
    backIntDenSignal3=getResult("IntDen",2);
    intBackgroundSignal=(backIntDenSignal1+backIntDenSignal2+backIntDenSignal3)/3;

// Récupération des ROI, calcul et sauvegarde de l'intensité du signal à quantifier

waitForUser( "Delete bakground ROI", "Delete the background ROI of the ROI Manager. \n\nPress OK
when you are done.");

while (counter2<=nombreKts)
{
    resultSignal = measureIntensitySignal (numeroLigne2, intSignal, areaSignal,
intBackgroundSignal, correctedIntSignal);
    setResult("Signal Intensity", numeroLigneResult2, resultSignal);
    numeroLigneResult2++;
    numeroLigne2++;
    counter2++;
}
saveAs("Measurements", fichier+ listelimages[n]+"-Resultats IntDen Signal.xls");

//Sauvegarde des images

selectWindow("SUM_"+c1Signal);
run("8-bit");
saveAs("Tiff", fichier+ listelimages[n]+"-SUM_"+c1Signal);
close();

selectWindow("SUM_"+c2Signal);
run("8-bit");
saveAs("Tiff", fichier+ listelimages[n]+"-SUM_"+c2Signal);
close();

selectWindow("SUM_"+c3Signal);
run("8-bit");
saveAs("Tiff", fichier+ listelimages[n]+"-SUM_"+c3Signal);
close();

```

2. Article autorisant la soutenance de la thèse

L'Ecole Doctorale Biologie, Santé, Biotechnologies demande la publication signée en premier auteur par l'étudiant d'un article scientifique dans un journal à comité de lecture pour autoriser la soutenance de la thèse. Nos travaux présentés ici portant sur le rôle de la voie sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate dans le contrôle de la division cellulaire sont en cours de préparation pour publication. Toutefois, nous avons précédemment publié un autre article où je signe en premier nom résultant d'une étude antérieure réalisée dans la précédente équipe de ma directrice de thèse Anastassia Hatzoglou. Ce travail porte sur le rôle de la GTPase Gem au cours de la mitose.

The GTPase Gem and its partner Kif9 are required for chromosome alignment, spindle length control, and mitotic progression

Guillaume Andrieu,^{*,†,‡} Muriel Quaranta,^{*,‡} Corinne Leprince,^{*,‡,1} and Anastassia Hatzoglou^{*,†,‡,1,2}

*Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Contrôle de la Prolifération, Centre National de la Recherche Scientifique–Unité Mixte de Recherche (CNRS-UMR) 5088, Toulouse, France;

[†]Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), CNRS-UMR 5089, Toulouse, France; and [‡]Université de Toulouse, Université Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France

ABSTRACT Within the Ras superfamily, Gem is a small GTP-binding protein that plays a role in regulating Ca²⁺ channels and cytoskeletal remodeling in interphase cells. Here, we report for the first time that Gem is a spindle-associated protein and is required for proper mitotic progression. Functionally, loss of Gem leads to misaligned chromosomes and prometaphase delay. On the basis of different experimental approaches, we demonstrate that loss of Gem by RNA interference induces spindle elongation, while its enforced expression results in spindle shortening. The spindle length phenotype is generated through deregulation of spindle dynamics on Gem depletion and requires the expression of its downstream effector, the kinesin Kif9. Loss of Kif9 induces spindle abnormalities similar to those observed when Gem expression is repressed by siRNA. We further identify Kif9 as a new regulator of spindle dynamics. Kif9 depletion increases the steady-state levels of spindle α -tubulin by increasing the rate of microtubule polymerization. Overall, this study demonstrates a novel mechanism by which Gem contributes to the mitotic progression by maintaining correct spindle length through the kinesin Kif9.—Andrieu, G., Quaranta, M., Leprince, C., Hatzoglou, A. The GTPase Gem and its partner Kif9 are required for chromosome alignment, spindle length control, and mitotic progression. *FASEB J.* 26, 5025–5034 (2012). www.fasebj.org

Key Words: cell division • cytoskeleton • microtubules • prometaphase

Abbreviations: DAPI, 6'-diamidino-2-phenylindole; GAP, GTPase-activating protein; GDP, guanosine diphosphate; GTP, guanosine triphosphate; GFP, green fluorescent protein; GTPase, guanosine triphosphatase; Gmip, Gem-interacting protein; Kif9, kinesin 9; MLC, myosin light chain; NEBD, nuclear envelope breakdown; PCR, polymerase chain reaction; PFA, paraformaldehyde; RGK, Rad, Gem/Kir; ROK, Rho kinase; RT-PCR, reverse transcription–polymerase chain reaction; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; siRNA small interfering RNA

GEM IS AN atypical protein of the Ras-related guanosine triphosphatase (GTPase) superfamily, whose expression is induced by mitogenic stimulations in several cell types (1–3). It belongs to the Rad, Gem/Kir (RGK) subfamily, including Rad (4) Gem (and its mouse ortholog Kir; refs. 1, 5), Rem1 (also known as Rem or Ges), and Rem2 proteins (6, 7), which share several striking characteristics (8). First, their expression is regulated at the transcription level. Second, they exhibit atypical nucleotide-binding motifs compared with other Ras family proteins, and therefore RGK proteins probably share an exclusive molecular mechanism for guanosine triphosphate (GTP) hydrolysis. Third, they carry both large N- and C-terminal extensions. Fourth, the C-terminal extension does not contain consensus lipid modification motifs but appears necessary for plasma membrane localization (8, 9).

RGK proteins have been shown to carry out two distinct functions: regulation of Ca²⁺ channels and cytoskeleton remodeling (8, 10). Ges, the human ortholog of murine Rem, promotes endothelial cell sprouting and reorganization of the actin cytoskeleton (11), while Gem promotes cell elongation and neurite extension (12, 13). Gem has been implicated in playing a role in cytoskeletal organization and immunofluorescence, and cell fractionation studies have localized part of Gem with actin microfilaments and microtubules. Gem antagonizes Rho kinase (ROK)-induced neurite retraction and causes stress fiber disassembly and focal adhesion dissolution in fibroblasts and epithelial cells (14, 15). Direct interaction of Gem with ROK inhibits ROK β -mediated phosphorylation of both myosin light-chain (MLC) and myosin-binding subunits, resulting in actin cytoskeleton rearrangements. In addition to this

¹ These authors contributed equally to this work.

² Correspondence: Anastassia Hatzoglou, IPBS, CNRS-UMR 5089, 205 route de Narbonne, BP 64182 Toulouse, France. E-mail: anastassia.hatzoglou@ipbs.fr
doi: 10.1096/fj.12-209460

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

mechanism, we have previously described another Gem-mediated cytoskeletal regulatory cascade. This signaling includes both the novel Gem-interacting protein (Gmip) and the membrane cytoskeletal linker Ezrin (12, 16). Gem-Ezrin interaction at the plasma membrane is required for the activation of Gmip, which functions as a RhoA GTPase-activating protein (GAP), leading to local inactivation of RhoA signaling (12). The identification of the microtubule-associated protein, kinesin 9 (Kif9), a member of the kinesin 9 family (17), as a Gem-binding partner, suggests Gem-dependent activation of downstream effectors at the level of microtubules (18). Furthermore, a second microtubule-associated protein, tau, abolishes Gem-induced cell elongation (19), although direct interaction between both proteins is lacking. These results suggest that Gem might regulate cytoskeleton-dependent cellular functions.

Mitosis is a cellular process that requires profound cytoskeletal reorganization to ensure precise spatial and temporal coordination of spindle assembly and positioning, chromosome segregation, and cytokinesis. To this end, microtubules and actin cytoskeleton undergo active remodeling, and both play essential roles during mitosis, including chromosome capture, congression, and segregation (20, 21). A growing body of evidence suggests that Rho GTPases, main cytoskeletal regulators in interphase, play a role at different steps of mitosis, including centrosome positioning, chromosome-kinetochore attachment, and spindle orientation and dynamics (22).

In the present study, we have examined the role of Gem GTPase during cell division. To the best of our knowledge, this is the first report describing Gem as a spindle-associated protein that regulates mitotic progression. We report that loss of Gem affects spindle length and dynamics, resulting in cell division arrest in prometaphase. We provide evidence that downstream effector Kif9 interacts with Gem and is responsible for Gem-induced mitotic effects. Overall, our study identifies Gem as a new regulator of mitotic spindle length, which is essential for accurate mitotic progression.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies, reagents, and constructs

Antibodies used were as follows: anti-green fluorescent protein (GFP; Roche Applied Sciences, Meylan, France); anti-Myc (Calbiochem; Merck Chemicals, Nottingham, UK); anti- α -tubulin and anti- γ -tubulin (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA); mouse monoclonal, anti-Kif9 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); goat and anti- α -tubulin (Abcam, Cambridge, UK); rabbit polyclonal and human serum anti-CREST (a gift from Dr. J. Goetz, Strasbourg Hospital, Strasbourg, France). Rabbit antibodies against Gem and Gmip were described previously (12, 16). Protease and phosphatase inhibitor cocktails were purchased from Roche Applied Sciences. The cyclin-dependent kinase 1 inhibitor RO3306 was obtained from Calbiochem, and the other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich.

The full-length human Gem sequence was amplified with Plus polymerase mixture from pRK5Gem plasmid (12) using the following primer pair: 5'-TCTGAATAATGTCACCATCGCCA-3' and 5'-AGAGAGGTCATGGCAGGATTTGGA-3'. The amplified product was digested by *EcoRI* and *BamHI* and subcloned into pEGFP-C1 (Clontech, Mountain View, CA, USA). The sequence was confirmed by DNA sequencing. The plasmid pCMV6 encoding chimeric GFP-human Kif9 (GFP-Kif9) was obtained from OriGene Technologies (Rockville, MD, USA).

Cell culture, small interfering RNAs (siRNAs), and transfection

HeLa and RPE1 cells were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). HeLa cells were cultured in DMEM and RPE1 cells in DMEM-F12, both supplemented with 10% FBS and antibiotics at 37°C and 5% CO₂. When mentioned, cells were synchronized in mitosis by nocodazole (200 ng/ml for 16 h) or RO3306 (10 μ M for 16 h) treatment, as described previously (23). siRNA duplexes were synthesized by Eurogentec (Liege, Belgium). The targeted sequences are 5'-CGUACGCGAAUACUUCGA-3' for control luciferase (not recognizing any human mRNA sequence); 5'-CAGAGGACAUUCCCAUAAU-3' (Gem siRNA2); 5'-GCCACCUACAUCAACAAU-3' (Kif9 siRNA); and 5'-GGAGGAAUACGCCCAAU-3' (Kif9 siRNA2). Gem siRNA1 sequences were previously described (12). Transfection of siRNAs into HeLa or RPE1 cells was performed using Interferin reagent (Ozyme, St. Quentin Yvelines, France), according to the manufacturer's instructions. After 48 h in culture, cells were either fixed and treated for immunofluorescence microscopy or lysed in Laemmli buffer before protein separation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotting. DNA transfection was performed using JetPEI (Ozyme) according to the manufacturer's instructions, and cells were analyzed 24 or 48 h post-transfection by immunofluorescence microscopy. For siRNA and plasmid double transfections, HeLa cells were plated into 24-well plates and were transfected 20 h later with siRNAs by using JetSI (Ozyme). After 24 h, 0.2 mg of plasmid was introduced to the cells using JetPEI reagent.

Total RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was extracted from cells using the RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) as described by the supplier. Each purified RNA preparation (2 μ g) was reversed transcribed for 50 min at 42°C in a 20- μ l reaction containing 0.5 μ g of random primers (Promega, Madison, WI, USA), 1 \times avian myeloblastosis virus reverse transcriptase buffer, 10 U of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Promega), 40 U of rRNasin (Promega), 10 mM DTT, and 0.5 mM deoxynucleotides (Promega). Incubating the samples for 15 min at 70°C stopped the reaction, and cDNAs were analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR). Quantitative PCR was carried out according to the manufacturer's instructions using Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) on a CFX96 real-time system device with the following primers: 5'-AGGTTGTCTCCTGCGACTTC-3' and 5'-ATGTAGGC-CATGAGGTCCAC-3' for GAPDH; 5'-AAGCTGGTCTCT-GACTCCA-3' and 5'-CACTTTCCCATCAACCATC-3' for Gem; 5'-TGACCTATGACCCCATGGAT-3' and 5'-CAGA-AATGGCTGCAAAGTCA-3' for Kif-9. All conditions (standard curve and samples) were performed in triplicates.

Immunoprecipitation and immunoblotting analysis

For coimmunoprecipitation studies, HeLa cells were transfected with GFP-Kif9 and Myc-Gem, GFP-Kif9 and Myc alone, or Myc-Gem. At 24 h post-transfection, cells were treated with 10 μ M RO3306 for 17 h. Cells were then released from RO3306 for 60 min, and mitotic cells were selected by mitotic shakeoff, washed twice with ice-cold PBS, and lysed in IP buffer (20 mM Tris, pH 7.5; 100 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 1% Triton X-100; and 5% glycerol) containing protease and phosphatase inhibitor cocktails. The lysates were cleared by centrifugation at 13,000 *g* for 10 min at 4°C and incubated with mouse monoclonal anti-GFP and goat anti-Kif9 antibodies or a nonrelated antibody for 2 h at 4°C under continuous agitation. Immune complexes were precipitated with a mix of protein A&G Sepharose beads for 1 h at 4°C. The beads were washed 3 times at 4°C with lysis buffer. Immunoprecipitates and total lysates were analyzed by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond ECL; GE Healthcare Life Sciences, Stockholm, Sweden), and blotted with appropriate antibodies. Immune complexes were revealed using appropriate antibodies, coupled to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories; Interchim, Montluçon, France), and ECL Plus reagent (Pierce; Interchim).

Immunofluorescence staining, live cell imaging, and image acquisition

HeLa cells were fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA) for 20 min at room temperature. Alternatively, cells were permeabilized prior to PFA fixation for 1 min in CB buffer (20 mM PIPES; pH 6.8; 300 mM NaCl; 10 mM EGTA; 10 mM MgCl₂; and 10 mM glucose) supplemented with 0.5% Triton X-100, then fixed with 4% PFA for 20 min at room temperature. Subsequently, cells were permeabilized with CB buffer containing 2% FCS and 0.2% Triton for 10 min and blocked in CB buffer containing 2% FCS and 0.02% Triton X-100 for 20 min. Coverslips were then incubated with primary antibodies and with secondary antibodies coupled to the relevant fluorochrome [Alexa Fluor 488-coupled antibodies from Molecular Probes (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), or Cy-3- and Cy-5-coupled antibodies from Jackson ImmunoResearch Laboratories]. After washes, cells were incubated in 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and mounted in Prolong Gold antifade reagent (Molecular Probes). Image acquisitions were made with an upright DM6000 microscope (Leica Microsystems SAS, Nanterre, France) equipped with a Cool Snap HQ² camera (Roper Scientific, Sarasota, FL, USA) and a \times 100 Plan APO N1.4 oil immersion objective (Leica). Images were analyzed using Metamorph (Universal Imaging, Downingtown, PA, USA) and ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) software.

For time-lapse microscopy, asynchronous HeLa cells were transfected with control or Gem siRNAs together with AllStars Control Alexa Fluor 488-conjugate siRNA (Qiagen). At 48 h post-transfection, cells were placed into a microscopy chamber heated to 37°C and maintained in a 5% CO₂ atmosphere and observed on an inverted Leica DMIRB microscope equipped with an \times 40 objective. Images were acquired every 2 min for 12 h. Only Alexa Fluor 488-positive cells were analyzed using ImageJ software. Duration of mitosis was estimated as the time from nuclear envelope breakdown (NEBD) until anaphase onset.

Spindle analysis and statistics

Spindle length was defined as the pole-to-pole distance in cells stained with anti- α -tubulin and anti- γ -tubulin antibodies

and DAPI. For spindle intensity quantification, at 48 h after siRNA transfection, cells were fixed with -20° C methanol for 5 min and stained with anti- α -tubulin antibodies and DAPI. Each mitotic cell was optically sectioned using a Leica DMIRB microscope equipped with an \times 100 objective. The 3-dimensional data (*z* stacks) were projected onto a single-image plane (maximal intensity projection) using ImageJ software. The fluorescence intensity was quantified in a defined region containing the entire spindle and corrected for background. The resulting intensity value was defined as the spindle intensity. The average of spindle intensities in control siRNA cells was set to 1. For microtubule polymerization assays, HeLa cells depleted for the indicated proteins were transfected with 0.5 μ g of GFP-EB3 plasmid for 24 h, synchronized at the G2/M transition for 17 h with 10 μ M RO3306, and released into fresh medium. Time-lapse acquisitions were performed every 500 ms for 30 s. Single microtubules were tracked, and their polymerization speed was determined by kymograph analysis using ImageJ.

Statistical analysis was performed by double-tailed Student's or ANOVA tests using GraphPad Prism software (GraphPad, San Diego, CA, USA).

RESULTS

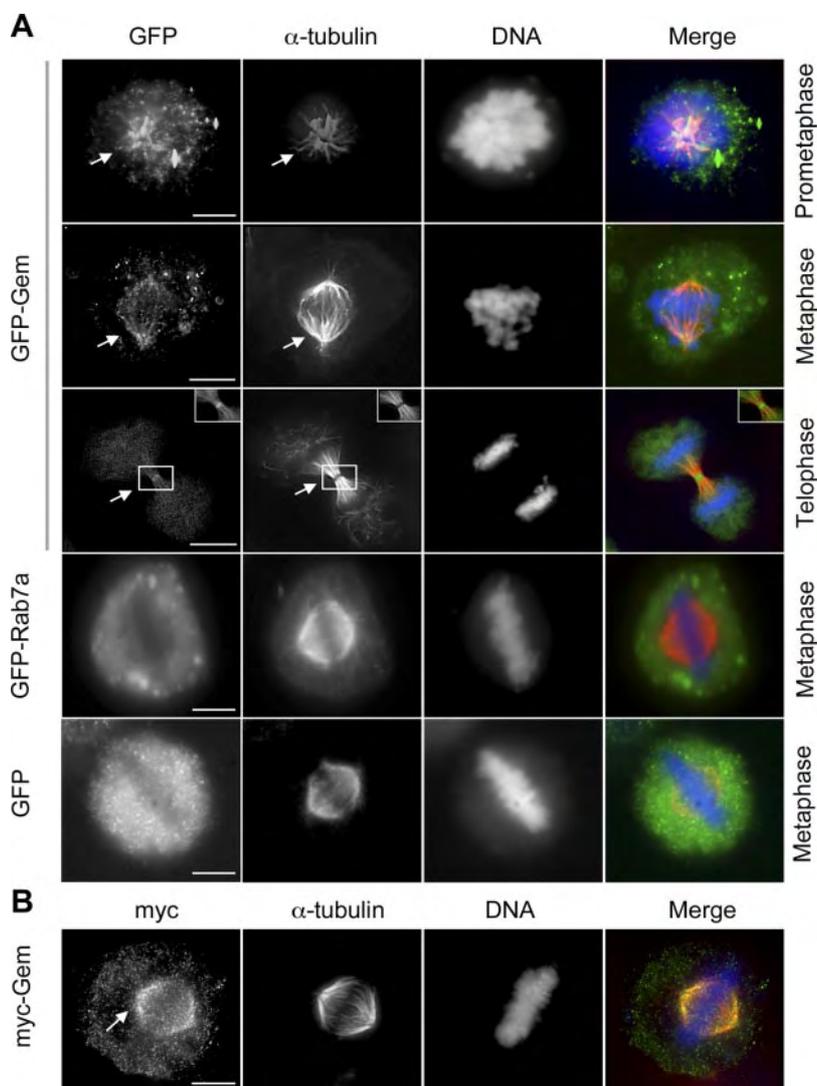
Subcellular distribution of Gem during mitosis

To elucidate a possible role of the Gem GTPase during cell division, its cell distribution was followed throughout mitosis. Because specific antibodies that recognize endogenous protein are not suitable for immunofluorescence studies, we produced a GFP fusion protein (GFP-Gem). GFP-Gem is targeted to the mitotic spindle from prometaphase to metaphase (Fig. 1A, arrows). From late anaphase to cytokinesis, Gem was found at the level of the central spindle and the midbody (Fig. 1A, arrows and insets). GFP alone or GFP fused to another Ras family GTPase, GFP-Rab7a, was excluded from the mitotic spindle (Fig. 1A). Finally, a Myc-tagged Gem protein showed the same intracellular distribution as GFP-Gem, indicating that the interaction with the spindle was Gem specific and not related to the tag (Fig. 1B). These data show that Gem is spindle associated and suggest a role for Gem during mitosis.

Depletion of Gem leads to misaligned chromosomes and delays mitotic progression

To gain insight into the function of Gem during mitosis, we depleted the endogenous Gem protein by RNA interference using two different siRNAs (Gem siRNA1 and Gem siRNA2; the specificity of Gem siRNA2 was previously documented in ref. 12). When HeLa cells were transfected with Gem siRNAs, the levels of endogenous Gem had decreased by 50–80% after 48 h of culture, as compared to control siRNA cells (Fig. 2A, bottom panel). In these Gem siRNA-treated cells, we observed a 3-fold increase in mitotic index (from 5.8 ± 0.48 to $17.5 \pm 0.99\%$, $n=5$; Fig. 2A, top panel), suggesting that Gem may be important for mitotic progression. To determine at which stage of

Figure 1. Dynamic localization of Gem during mitosis. *A*) Mitotic HeLa cells-expressing GFP-Gem, GFP alone, or GFP-Rab7a. GFP fluorescence is shown in the first column, microtubules stained with an antibody against α -tubulin in the second column, and DNA stained with DAPI in the third column. The fourth column shows the 3-color merged images of GFP-Gem (green), microtubules (red), and DNA (blue). Cells in various stages of mitosis are shown as indicated. Arrows indicate spindle localization of Gem. Inserts represent magnified regions. *B*) Mitotic HeLa cell expressing Myc-Gem and stained with antibodies against Myc (green) and α -tubulin (red); DNA stained with DAPI (blue). All of the images are representative of the population examined. Scale bars = 10 μ m.



mitosis Gem-depleted cells accumulated, we analyzed the number of mitotic cells at various stages of mitosis by staining for the centromere protein CREST, as well as α -tubulin and DNA in asynchronous cell cultures. Quantified frequency of each mitotic stage revealed a 2-fold increase of Gem-depleted cells in prometaphase compared to control cells (Fig. 2B).

Further analysis revealed that prometaphase delay was associated with defects in chromosome behavior: in Gem-depleted cells, the chromosomes failed to align properly at the metaphase plate, and several chromosomes were distributed throughout the cell (Fig. 2C, top panel) when compared to the highly aligned chromosomes along the equatorial plane in control cells. Quantification revealed a >4-fold increase in mitotic cells with misaligned chromosomes on Gem depletion (32.67 ± 2.6 vs. $8.63 \pm 1.05\%$; Fig. 2C, bottom panel). The mitotic function of Gem was analyzed by time-lapse imaging of control and Gem-depleted asynchronous cells (Fig. 2D, E). Quantitative analysis of mitotic progression indicated that Gem depletion increases the duration of prometaphase (from NEBD to anaphase onset) by 45% compared to control cells. Thus, Gem is

required for efficient chromosome congression to metaphase plate and for timely onset of anaphase.

Failure of chromosomes to align properly on the spindle typically triggers the spindle checkpoint, which delays metaphase to anaphase transition until errors have been corrected (24). Gem siRNA-treated cells and control cells accumulated in mitosis to a similar extent when treated with nocodazole, a spindle checkpoint activator (Supplemental Fig. S1A), suggesting that the spindle checkpoint is active in Gem-depleted cells, and therefore that Gem is unlikely to be involved in this checkpoint. Furthermore, depletion of Gem from T47D cells, which are deficient in the spindle checkpoint (25, 26), failed to induce prometaphase accumulation (Supplemental Fig. S1B). Collectively, these data demonstrate for the first time that Gem is essential for chromosome alignment and progression through mitosis.

Gem expression regulates spindle length and dynamics

To understand how spindle-associated Gem controls chromosome alignment, we investigated the role of Gem

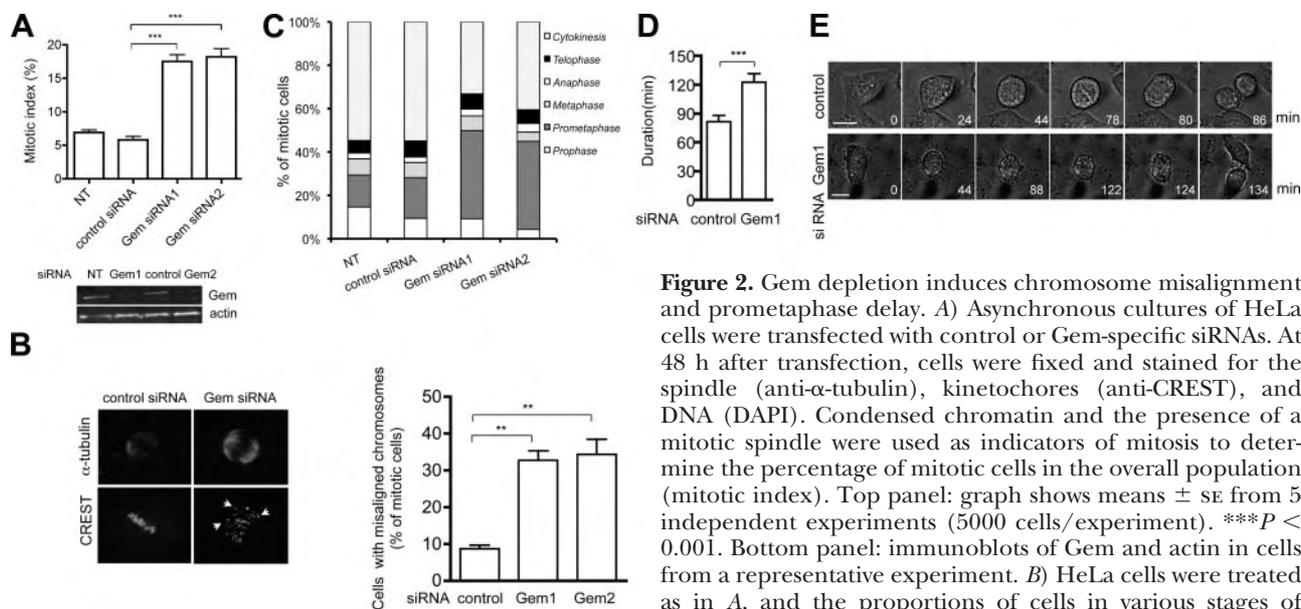


Figure 2. Gem depletion induces chromosome misalignment and prometaphase delay. *A*) Asynchronous cultures of HeLa cells were transfected with control or Gem-specific siRNAs. At 48 h after transfection, cells were fixed and stained for the spindle (anti- α -tubulin), kinetochores (anti-CREST), and DNA (DAPI). Condensed chromatin and the presence of a mitotic spindle were used as indicators of mitosis to determine the percentage of mitotic cells in the overall population (mitotic index). Top panel: graph shows means \pm SE from 5 independent experiments (5000 cells/experiment). *** P < 0.001. Bottom panel: immunoblots of Gem and actin in cells from a representative experiment. *B*) HeLa cells were treated as in *A*, and the proportions of cells in various stages of mitosis were determined by microscopy analysis. Data are

representative of 3 independent experiments (400 mitotic cells/experiment). *C*) HeLa cells were transfected with control or Gem-specific siRNAs and 48 h later treated for 1 h with the proteasome inhibitor MG132 (2 μ M) to block metaphase anaphase transition, then fixed and stained for the spindle (anti- α -tubulin), kinetochores (anti-CREST), and DNA (DAPI). Metaphase cells were scored by immunofluorescence staining of the kinetochores and the spindle. Left panel: images of representative metaphase cells in control and Gem-depleted cells. Arrows indicate unaligned chromosomes. Right panel: cells with unaligned chromosomes were quantified and expressed as a percentage of total mitotic cells. Data are means \pm SE of 3 independent experiments (500 mitotic cells/experiment). ** P < 0.01. *D, E*) Asynchronous cultures of HeLa cells were transfected with control or Gem-specific siRNAs and imaged by time-lapse video microscopy, starting 48 h after transfection. Images were captured every 2 min to monitor mitotic progression. *D*) Duration from NEBD until anaphase onset was determined for control and Gem-depleted cells. Graphs show means \pm SE of Gem siRNA, n = 29; control siRNA, n = 19. *** P < 0.001. *E*) Frames from time-lapse movies of representative Gem-depleted and control cells. Scale bars = 10 μ m.

in spindle assembly, dynamics, and function. Control and Gem-depleted cells were stained with anti- γ -tubulin antibodies to visualize centrosomes and subjected to analysis. In Gem-depleted cells, although bipolar spindles were formed, the distance between the two centrosomes increased by 32% compared to control cells (Fig. 3A, B). In agreement with this conclusion, spindle length was decreased in Gem-overexpressing HeLa cells when compared to control cells (Fig. 3C). Overexpression of the S89A mutant of Gem, which is unable to switch to the active GTP-bound state (9, 12), has no effect on spindle length (Fig. 3C). Thus, we conclude that Gem-induced spindle defects require a catalytically active form of Gem and guanosine diphosphate (GDP)-GTP cycling. Similar results were obtained with immortalized nontransformed RPE1 cells (Supplemental Fig. S2), suggesting that the role of Gem in spindle length is common to various cell types. Together, these data suggest that Gem is required for spindle length maintenance.

Because spindle dynamics is important for maintaining consistent pole-to-pole distance (27), we assessed whether Gem modulates the steady-state level of microtubules and spindle dynamics during mitosis. Spindle microtubule density was measured by total α -tubulin immunofluorescence intensity. Microtubule density was increased by 54% in Gem-depleted cells compared to control cells (Fig. 3D). Under conditions that depolymerize unstable microtubules, such as cold (not

shown) or limited incubation with nocodazole, microtubule density was three-fold higher in Gem-depleted cells than in control cells (Fig. 3D). To investigate the role of Gem on spindle dynamics, we determined the kinetics of microtubule polymerization. Control or Gem-depleted cells were treated with 1 μ g/ml nocodazole for 10 min. As shown in Fig. 3E, nocodazole completely disassembled spindle microtubules in a similar way in both control and Gem-depleted cells. Cells were then released into fresh medium, and the rate of microtubule repolymerization was analyzed kinetically. Quantitative analysis showed that Gem-depleted mitotic cells repolymerize microtubules faster than control cells (Fig. 3E). Time-lapse video microscopy in living cells (data not shown) further supported the observation that loss of Gem increased the rate of single microtubule polymerization.

Knockdown of Kif9 phenocopies the depletion of Gem

We next identified the cellular target of Gem responsible for regulating spindle dynamics. Since several mitotic kinesins regulate spindle dynamics and chromosome alignment (28), we considered that among the known partners of Gem that might mediate its mitotic functions, Kif9 was an attractive candidate. It has been shown that Gem and Kif9 interact at a molecular level

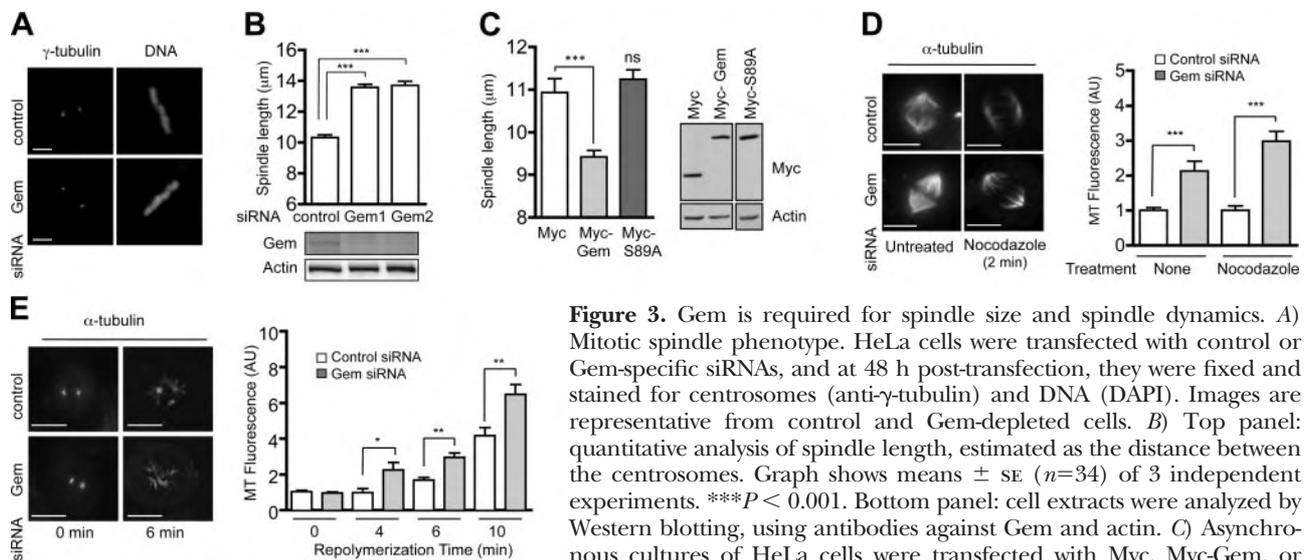


Figure 3. Gem is required for spindle size and spindle dynamics. *A*) Mitotic spindle phenotype. HeLa cells were transfected with control or Gem-specific siRNAs, and at 48 h post-transfection, they were fixed and stained for centrosomes (anti- γ -tubulin) and DNA (DAPI). Images are representative from control and Gem-depleted cells. *B*) Top panel: quantitative analysis of spindle length, estimated as the distance between the centrosomes. Graph shows means \pm SE ($n=34$) of 3 independent experiments. $***P < 0.001$. Bottom panel: cell extracts were analyzed by Western blotting, using antibodies against Gem and actin. *C*) Asynchronous cultures of HeLa cells were transfected with Myc, Myc-Gem, or Myc-S89A, and 24 h after transfection, they were fixed and stained for the

spindle (anti- α -tubulin), centrosomes (anti- γ -tubulin), and anti-Myc. Left panel: spindle length was measured in HeLa cells expressing Myc or Myc-fusion proteins as in *A*. Data are means \pm SE ($n=38$) of 3 independent experiments. Right panel: cell extracts were analyzed by Western blotting, using antibodies against Myc and actin. *D*) HeLa cells were transfected with control or Gem siRNAs. After 48 h, cells were stained for α -tubulin and DNA. Images were acquired under constant exposure time for the α -tubulin channel. Total fluorescence intensity for α -tubulin on metaphase spindle ($n=21$ cells/condition) was quantified in Gem-depleted metaphase cells and normalized to their respective control siRNA cells. In addition, siRNA-transfected cells were treated with 1 μ g/ml nocodazole for 2 min at 37°C, and microtubule fluorescence intensity of Gem-depleted metaphase cells was quantified and normalized to their respective control siRNA cells ($n=28$). Left panel: representative images of spindle morphology in untreated and nocodazole-treated cells. Right panel: means \pm SE from 2 independent experiments. *E*) Control or Gem-depleted cells were treated with 1 μ g/ml nocodazole for 10 min at 37°C to completely depolymerize the mitotic spindle. These nocodazole-treated cells were then washed twice with prewarmed PBS, released into fresh medium without nocodazole, and fixed at 0, 4, 6, and 10 min after release. Cells were then stained for α -tubulin and DNA, and images for α -tubulin were acquired under constant exposure time. Microtubule fluorescence intensity was quantified as in *D*. Left panel: representative images of cells showing spindle morphology at 0 and 6 min after release from nocodazole and staining for α -tubulin. Right panel: quantification of microtubule fluorescence intensity in control and Kif9 siRNA cells from 2 independent experiments ($n=30$). Scale bars = 10 μ m. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$.

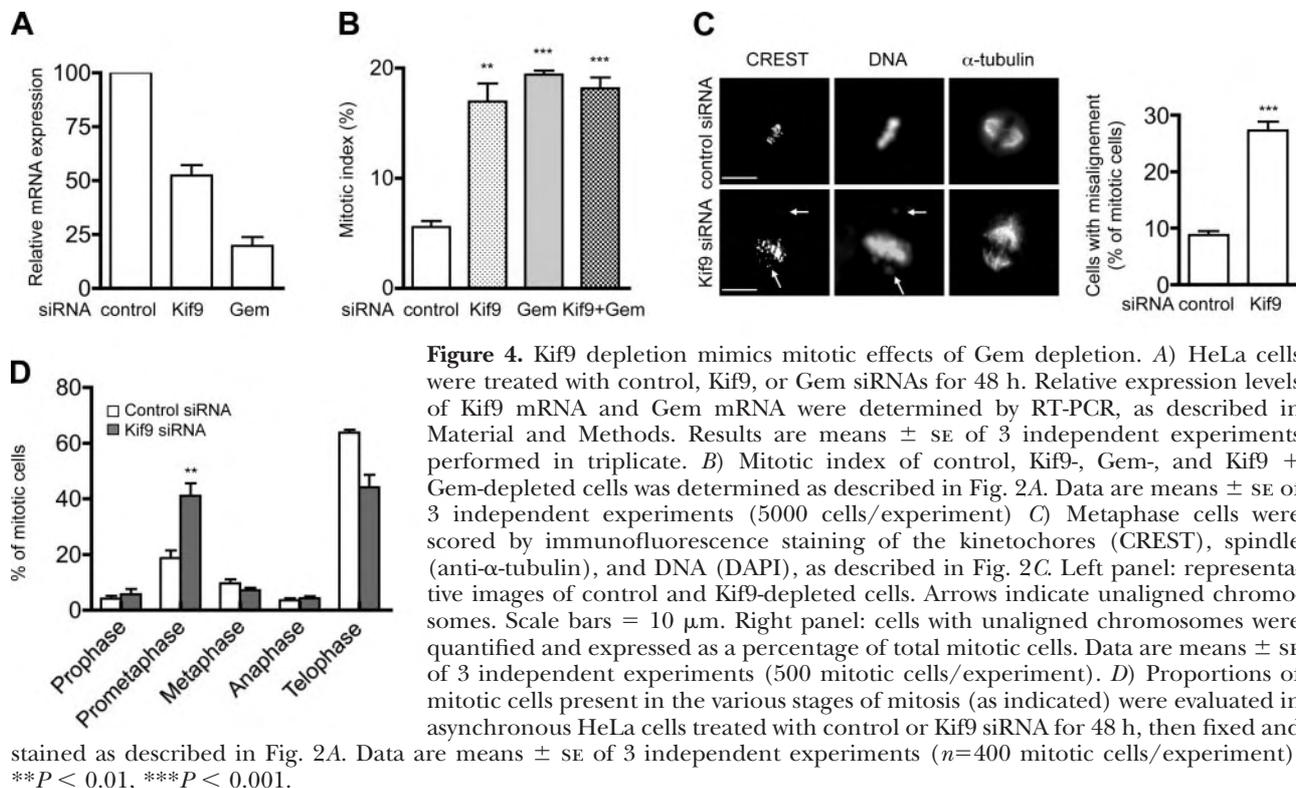
in a yeast 2-hybrid assay, coimmunoprecipitate, and bind to the microtubule cytoskeleton biochemically (18). To examine a possible role of Kif9 in mitotic progression, HeLa cells were treated with two sets of Kif9-specific siRNAs or with control siRNAs, and Kif9 mRNA expression level was estimated by reverse transcription PCR (RT-PCR; Fig. 4A) and immunofluorescence (see Fig. 6A). Because similar results have been obtained with both Kif9 siRNAs, hereafter, we present results for only one Kif9 siRNA. In asynchronous cells, partial depletion of Kif9 resulted in a 3-fold increase of mitotic index (16.60 ± 1.62 vs. $5.57 \pm 0.54\%$, respectively; Fig. 4B). This increase was due to a slower rate of progression through mitosis, as indicated by a prometaphase delay (33% in Kif9 siRNA cells vs. 15% in control siRNA cells; Fig. 4D). Finally, Kif9 depletion increased metaphase cells with misaligned chromosomes (27.25 ± 1.54 vs. $8.75 \pm 0.72\%$; Fig. 4C).

To determine the effect of Kif9 on spindle dynamics, we analyzed the spindle morphology and function in Kif9-depleted cells. First, pole-to-pole distance was increased in Kif9-depleted cells (Fig. 5A). Second, microtubule density was increased in untreated or nocodazole-treated Kif9 siRNA cells, as compared to control siRNA cells (Fig. 5B). Third, in the microtubule polymerization assay, partial knockdown of Kif9 promoted

microtubule repolymerization on release from nocodazole treatment (Fig. 5C, D). Finally, we analyzed the effect of Kif9 depletion on the polymerization rate of single microtubules directly by time-lapse video microscopy in living cells, as described in Materials and Methods. Loss of Kif9 significantly increased the rate of single-microtubule polymerization when compared to control cells (Fig. 5E), consolidating our evidence that Kif9 controls spindle length and inhibits microtubule growth. Thus, similar phenotypes on spindle morphology and dynamics were observed in Gem- and Kif9-depleted cells (Figs. 3 vs. 5). Taken together, these results show that loss of Kif9 fully mimics insufficiency of Gem-depleted cells. When both Gem and Kif-9 were depleted, no additive effects were observed, further suggesting that they may act in the same pathway (Figs. 4B and 5A). Taken together, these results strongly suggest that Kif9 might mediate Gem-induced spindle length phenotype.

Kif9 is a spindle-associated protein, and its expression is required for Gem-induced spindle length control

We next studied the intracellular localization of Kif9 in mitotic cells. In untreated HeLa cells, endogenous Kif9



was most prominently localized at the spindle of mitotic cells. This staining at the mitotic spindle was specific, since it was strongly reduced in cells depleted for Kif9 by siRNA (Fig. 6A).

Consistent with these observations, in GFP- or GFP-Kif9-overexpressing HeLa cells, EGFP-tagged Kif9 protein was targeted to the centrosome and mitotic spindle, while GFP alone was excluded (Fig. 6B). Further analysis revealed that in Myc-Gem-overexpressing HeLa cells, endogenous Kif9 colocalized with Gem at the level of the spindle (Fig. 6C). Thus, these findings show that Kif9 is a spindle-associated protein and colocalizes with Gem at the spindle during mitosis. To investigate whether a Gem-Kif9 complex exists in mitotic cells, we performed immunoprecipitation experiments.

We demonstrated an association between Kif9 and Gem, since overexpressed Myc-Gem coimmunoprecipitated with endogenous Kif9, and GFP-Kif9 coimmunoprecipitates with Myc-Gem but not Myc alone (Fig. 6D). Our results demonstrate that Gem coimmunoprecipitates with Kif9 in mitotic cells, suggesting that Kif9 mediates Gem-induced spindle shortening. To examine this hypothesis, HeLa cells were first knocked down for Kif9 and then transfected with Myc-Gem; thereafter, spindle length was evaluated. As shown in Fig. 6E, Gem-induced spindle shortening was completely abolished in Kif9-depleted cells, indicating that Kif9 acts downstream of Gem. Taken together, these results demonstrate that Kif9 interacts with Gem, and Kif9 expression is required for Gem-induced spindle-length phenotype.

DISCUSSION

The data presented here report for the first time that Gem plays a role in mitotic progression. Our study shows that Gem localizes to the spindle and contributes to the spindle length control by regulating spindle dynamics through the action of the kinesin Kif9. Defects in this mechanism generate unaligned chromosomes, which results in a delay in progress through mitosis at prometaphase.

Using siRNA and ectopic expression approaches, we demonstrate that Gem is required for maintaining correct spindle size, which represents a novel role of Gem. Loss of Gem induces spindle elongation, while its overexpression results in spindle shortening. There are several models to explain how the spindle maintains a constant length, including regulation of microtubule dynamics, a balance of pushing and pulling forces, and a spatial balance of diffusible morphogens (27). Gem might regulate spindle dynamics, as was described for another GTPase, the protein Ran (29). Indeed, depletion of Gem increased the steady-state levels of microtubules and the speed of microtubule repolymerization, suggesting a role for Gem in destabilizing mitotic microtubules. Consistent with this, Gem associates with the spindle microtubules at early mitotic stages. However, the presence of Gem at the spindle is insufficient to trigger spindle length shortening, and this effect requires Gem active molecules. Indeed, S89A and S89N (not shown) mutants of Gem, which are unable to switch to the active GTP-bound state (12, 14), failed to induce spindle shortening on overexpression. Interestingly, the S89A mutant was localized at the mitotic

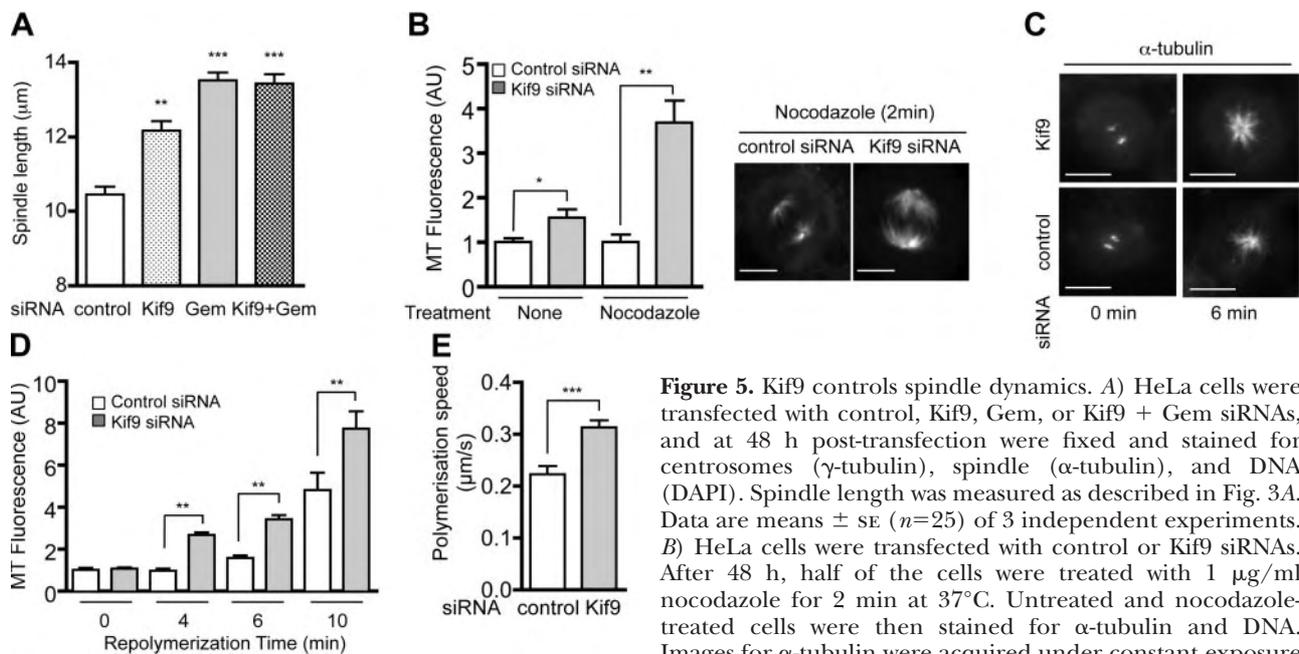


Figure 5. Kif9 controls spindle dynamics. *A*) HeLa cells were transfected with control, Kif9, Gem, or Kif9 + Gem siRNAs, and at 48 h post-transfection were fixed and stained for centrosomes (γ -tubulin), spindle (α -tubulin), and DNA (DAPI). Spindle length was measured as described in Fig. 3A. Data are means \pm SE ($n=25$) of 3 independent experiments. *B*) HeLa cells were transfected with control or Kif9 siRNAs. After 48 h, half of the cells were treated with 1 μ g/ml nocodazole for 2 min at 37°C. Untreated and nocodazole-treated cells were then stained for α -tubulin and DNA. Images for α -tubulin were acquired under constant exposure time. Fluorescence intensity of the microtubules in Kif9 siRNA metaphase cells was quantified and normalized to their respective control siRNA cells. Right panel: representative images of nocodazole-resistant microtubules in control and Kif9-depleted cells. Left panel: quantification of microtubule fluorescence intensity in control and Kif9 siRNA cells from 2 independent experiments ($n=30$). *C, D*) Control or Kif9-depleted cells were treated with 1 μ g/ml nocodazole for 10 min at 37°C to completely depolymerize the mitotic spindle. These nocodazole-treated cells were then released into fresh medium without nocodazole and fixed at 0, 4, 6, and 10-min post release. *C*) Representative images of cells showing microtubule repolymerization at 0 and 4 min after release from nocodazole. *D*) Microtubule fluorescence intensity was quantified as in *B* ($n=20$). *E*) Control or Kif9 siRNA-treated cells expressing the microtubule plus end-associated protein GFP-EB3 were synchronized at G2/M phase by using RO3306, then released into medium without the inhibitor, and microtubule polymerization speed (μ m/s) was measured by videomicroscopy. Graph shows mean \pm SE ($n=50$ cells; 10 microtubules/cell) from 2 independent experiments. Scale bars = 10 μ m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Student's *t* test.

spindle similarly to Gem wild type (data not shown), suggesting that activation of Gem occurs at the level of the mitotic spindle. Molecules that elicit exchange of GDP to GTP on Gem or stabilize the GTP-bound form were unknown until today; therefore, we could not identify the mechanism by which Gem switches to the GTP-bound state at the mitotic spindle.

An important question is how Gem mechanistically controls spindle length and dynamics. A growing body of evidence outlines the importance of several kinesins, grouped as mitotic kinesins, in the regulation of spindle microtubule dynamics (28, 30). The kinesin Kif9 links Gem to the interphase microtubule cytoskeleton, but the physiological role of this interaction remains unknown. Kif9 belongs to the kinesin 9 family (17), as Klp1, which has been shown to control flagellum motility (31, 32). Kif9 has also been implicated in matrix degradation (33) and microtubule–nucleus interactions (34), but other cellular functions, in particular, a role in mitosis, were previously unknown.

Here, we show that Kif9 localizes to the spindle and is required for maintaining accurate spindle length. Loss of Kif9 increased microtubule density and spindle microtubule polymerization. These findings establish Kif9 as a new mitotic kinesin and indicate a role for Kif9 in destabilizing mitotic microtubules, thus explaining why spindles are longer when Kif9 is depleted. A similar

mechanism has been described for other mitotic kinesins (30, 35). Similar phenotypes in spindle length and mitotic progression were observed after loss of Kif9 or Gem, suggesting that they might act in the same pathway. The fact that Gem overexpression failed to induce spindle length shortening in cells where the level of Kif9 had been knocked down by siRNAs demonstrates that Gem, indeed, requires Kif9 expression to exert its spindle length effect. This was further supported by the fact that simultaneous depletion of both Gem and Kif9 does not result in additive effects. Both proteins partially colocalize at the level of the mitotic spindle and further argue for Gem/Kif9 signaling acting locally to control the spindle dynamics and contributing to the maintenance of spindle length.

What are the consequences of altering spindle dynamics, which are major regulators of spindle assembly, chromosome attachment, and segregation? We find that Gem or Kif9 depletion generates a high frequency of unaligned chromosomes that impair progress through prometaphase. Failure of chromosomes to align properly on the spindle typically triggers the spindle checkpoint, which delays metaphase, preventing precocious chromosome segregation and ensuring accurate partition of the genetic material to daughter cells (24). Gem-induced prometaphase delay was due to a sustained activation of the spindle checkpoint, since Gem

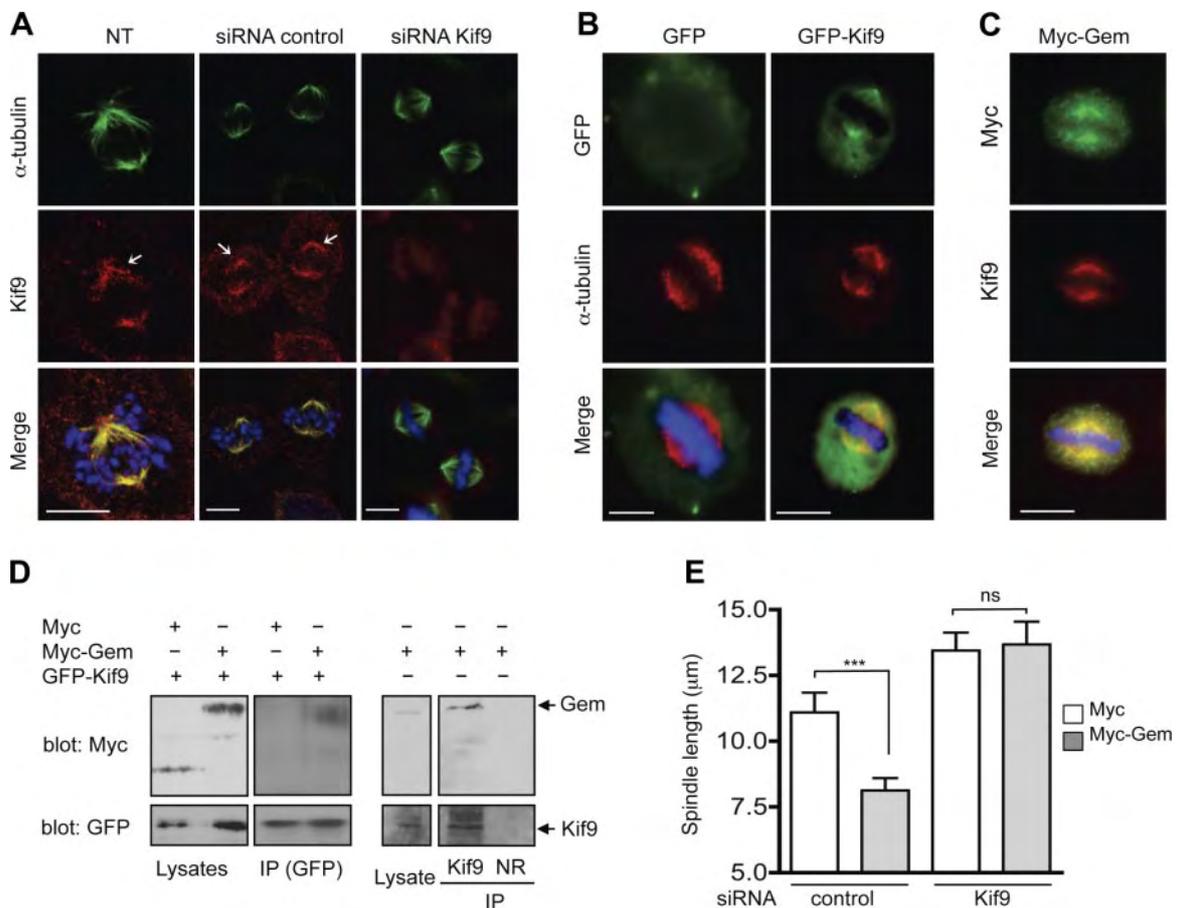


Figure 6. Kif9 localizes to the mitotic spindle, and its expression is necessary for Gem-induced spindle length phenotype. *A*) Endogenous Kif9 localizes at the mitotic spindle. Nontreated (NT), control siRNA, or Kif9 siRNA HeLa cells were stained with anti-Kif9 (red), anti- α -tubulin (green), and DAPI (blue). Images are representative of the population examined. *B*) Mitotic HeLa cells expressing GFP alone, GFP-Kif9, or Myc-Gem. HeLa cells were transfected with GFP or GFP-Kif9 and stained for spindle with α -tubulin (red) and DNA with DAPI (blue). *C*) Alternatively, Myc-Gem overexpressing HeLa cells were fixed and stained with anti-Myc (green), anti-Kif9 (red), and DAPI (blue). Images are representative of the population examined. Scale bars = 10 μ m. *D*) Kif9 associates with Gem. Left panel: coimmunoprecipitation of Kif9 and Gem. HeLa cells were transfected with vectors expressing GFP-Kif9 with Myc-Gem or GFP-Kif9 with Myc alone. Kif9 was immunoprecipitated with anti-GFP antibodies, and associated Kif9 proteins were detected by Western blotting. Right panel: endogenous Kif9 interacts *in vivo* with Gem. HeLa cells were transfected with Myc-Gem-expressing vector. Lysate was divided in two and immunoprecipitated either with anti-Kif9 or with a nonrelated (NR) antibody as control. Proteins associated with endogenous Kif9 were detected by Western blotting. *E*) Control or Kif9-depleted HeLa cells were transfected with vectors expressing Myc or Myc-Gem, fixed, and stained for Myc expression (anti-Myc), centrosomes (anti- γ -tubulin) and DNA (DAPI). Spindle length was measured as described in Fig. 3B. Graphs show means \pm SE ($n=30$) of 3 independent experiments. ns, not significant. *** $P < 0.001$.

depletion from spindle checkpoint-deficient T47D cells (25) did not affect mitotic progression. This checkpoint might be activated by Gem/Kif9 depletion, altering microtubule dynamics, which is known to maintain the spindle checkpoint activity.

Precisely how Gem, a small GTPase, might regulate the activity of Kif9 is not yet clear. Gem might simply be regulating the motor activity of Kif9, as already proposed for Rab6 on Rabkinesin6 (36) and Ran (37). Alternatively, if Gem interacts with actin-binding proteins, it may function in bridging the microtubule and actin cytoskeleton together during mitosis, as already described for Rad (38). A third possibility is that the binding of Kif9 to Gem would be a way to recruit it on microtubules, as was already reported for other GT-Pases (29, 39). Further investigation will be required to

understand how and in which circumstances Gem and other members of the Ras family exert their actions to regulate the activity of motor kinesins and their downstream pathways. **FJ**

The authors thank Dr. J. Goetz (Hôpital de Strasbourg, Strasbourg, France) for CREST serum; N. Galjart (Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands) for EB3-GFP plasmid; A. Ledoux, B. Caussares, and I. Dais for their contribution; and the Toulouse Réseau Imagerie-Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Contrôle de la Prolifération (TRI-LBCCMCP) microscopy facilities [Université Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France]. This work was supported by grants from Ligue Nationale Contre le Cancer and Université de Toulouse, UPS, to A.H. G.A. was supported by a Ph.D. fellowship from Ministère de l'Éducation Nationale.

REFERENCES

- Maguire, J., Santoro, T., Jensen, P., Siebenlist, U., Yewdell, J., and Kelly, K. (1994) Gem: an induced, immediate early protein belonging to the Ras family. *Science* **265**, 241–244
- Vanhove, B., Hofer-Warbinek, R., Kapetanopoulos, A., Hofer, E., Bach, F. H., and de Martin, R. (1997) Gem, a GTP-binding protein from mitogen-stimulated T cells, is induced in endothelial cells upon activation by inflammatory cytokines. *Endothelium* **5**, 51–61
- Iyer, V. R., Eisen, M. B., Ross, D. T., Schuler, G., Moore, T., Lee, J. C., Trent, J. M., Staudt, L. M., Hudson, J. Jr., Boguski, M. S., Lashkari, D., Shalon, D., Botstein, D., and Brown, P. O. (1999) The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* **283**, 83–7
- Reynet, C., and Kahn, C. R. (1993) Rad: a member of the Ras family overexpressed in muscle of type II diabetic humans. *Science* **262**, 1441–1444
- Cohen, L., Mohr, R., Chen, Y. Y., Huang, M., Kato, R., Dorin, D., Tamanoi, F., Goga, A., Afar, D., Rosenberg, N., and Witte, O. (1994) Transcriptional activation of a Ras-like gene (kir) by oncogenic tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 12448–12452
- Finlin, B. S., and Andres, D. A. (1997) Rem is a new member of the Rad- and Gem/Kir Ras-related GTP-binding protein family repressed by lipopolysaccharide stimulation. *J. Biol. Chem.* **272**, 21982–21988
- Finlin, B. S., Shao, H., Kadono-Okuda, K., Guo, N., and Andres, D. A. (2000) Rem2, a new member of the Rem/Rad/Gem/Kir family of Ras-related GTPases. *Biochem. J.* **347**, 223–231
- Correll, R. N., Pang, C., Niedowicz, D. M., Finlin, B. S., and Andres, D. A. (2008) The RGK family of GTP-binding proteins: regulators of voltage-dependent calcium channels and cytoskeleton remodeling. *Cell. Signal.* **20**, 292–300
- Kelly, K. (2005) The RGK family: a regulatory tail of small GTP-binding proteins. *Trends Cell Biol.* **15**, 640–643
- Beguín, P., Nagashima, K., Gonoï, T., Shibasaki, T., Takahashi, K., Kashima, Y., Ozaki, N., Geering, K., Iwanaga, T., and Seino, S. (2001) Regulation of Ca²⁺ channel expression at the cell surface by the small G-protein kir/Gem. *Nature* **411**, 701–706
- Pan, J. Y., Ficles, W. E., White, A. M., Egerton, M. M., and Silberstein, D. S. (2000) Ges, A human GTPase of the Rad/Gem/Kir family, promotes endothelial cell sprouting and cytoskeleton reorganization. *J. Cell Biol.* **149**, 1107–1116
- Hatzoglou, A., Ader, I., Splingard, A., Flanders, J., Saade, E., Leroy, I., Traver, S., Aresta, S., and de Gunzburg, J. (2007) Gem associates with Ezrin and acts via the Rho-GAP protein Gmp12 to down-regulate the Rho pathway. *Mol. Biol. Cell.* **18**, 1242–1252
- Leone, A., Mitsiades, N., Ward, Y., Spinelli, B., Poulaki, V., Tsokos, M., and Kelly, K. (2001) The Gem GTP-binding protein promotes morphological differentiation in neuroblastoma. *Oncogene* **20**, 3217–3225
- Ward, Y., Yap, S. F., Ravichandran, V., Matsumura, F., Ito, M., Spinelli, B., and Kelly, K. (2002) The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of the Rho-Rho kinase pathway. *J. Cell Biol.* **157**, 291–302
- Ward, Y., Spinelli, B., Quon, M. J., Chen, H., Ikeda, S. R., and Kelly, K. (2004) Phosphorylation of critical serine residues in Gem separates cytoskeletal reorganization from down-regulation of calcium channel activity. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 651–661
- Aresta, S., de Tand-Heim, M. F., Beranger, F., and de Gunzburg, J. (2002) A novel Rho GTPase-activating-protein interacts with Gem, a member of the Ras superfamily of GTPases. *Biochem. J.* **367**, 57–65
- Lawrence, C. J., Dawe, R. K., Christie, K. R., Cleveland, D. W., Dawson, S. C., Endow, S. A., Goldstein, L. S., Goodson, H. V., Hirokawa, N., Howard, J., Malmberg, R. L., McIntosh, J. R., Miki, H., Mitchison, T. J., Okada, Y., Reddy, A. S. N., Saxton, W. M., Schliwa, M., Scholey, J. M., Vale, R. D., Walczak, C. E., and Wordeman, L. (2004) A standardized kinesin nomenclature. *J. Cell Biol.* **167**, 19–22
- Piddini, E., Schmid, J. A., de Martin, R., and Dotti, C. G. (2001) The Ras-like GTPase Gem is involved in cell shape remodelling and interacts with the novel kinesin-like protein KIF9. *EMBO J.* **20**, 4076–4087
- Oyama, F., Kotliarova, S., Harada, A., Ito, M., Miyazaki, H., Ueyama, Y., Hirokawa, N., Nukina, N., and Ihara, Y. (2004) Gem GTPase and tau: morphological changes induced by gem GTPase in CHO cells are antagonized by tau. *J. Biol. Chem.* **279**, 27272–27277
- Kline-Smith, S. L., and Walczak, C. E. (2004) Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: refocusing on microtubule dynamics. *Mol. Cell* **15**, 317–327
- Kunda, P., and Baum, B. (2009) The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning. *Trends Cell Biol.* **19**, 174–179
- Narumiya, S., and Yasuda, S. (2006) Rho GTPases in animal cell mitosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 199–205
- Vassilev, L. T. (2006) Cell cycle synchronization at the G2/M phase border by reversible inhibition of CDK1. *Cell Cycle* **5**, 2555–2556
- Lew, D. J., and Burke, D. J. (2003) The spindle assembly and spindle position checkpoints. *Annu. Rev. Genet.* **37**, 251–282
- Li, Y., and Benzra, R. (1996) Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. *Science* **274**, 246–248
- Birk, M., Bürkle, A., Pekari, K., Maier, T., and Schmidt, M. (2012) Cell cycle-dependent cytotoxicity and mitotic spindle checkpoint dependency of investigational and approved antimitotic agents. *Int. J. Cancer* **130**, 798–807
- Goshima, G., and Scholey, J. M. (2010) Control of mitotic spindle length. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **10**, 21–57
- Mazumdar, M., and Misteli, T. (2005) Chromokinesins: multi-talented players in mitosis. *Trends Cell Biol.* **15**, 349–355
- Wilde, A., Lizarraga, S. B., Zhang, L., Wiese, C., Gliksman, N. R., Walczak, C. E., and Zheng, Y. (2001) Ran stimulates spindle assembly by altering microtubule dynamics and the balance of motor activities. *Nat. Cell Biol.* **3**, 221–227
- Ems-McClung, S. C., and Walczak, C. E. (2010) Kinesin-13s in mitosis: Key players in the spatial and temporal organization of spindle microtubules. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 276–282
- Yokoyama, R., O’toole, E., Ghosh, S., and Mitchell, D. R. (2004) Regulation of flagellar dynein activity by a central pair kinesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 17398–17403
- Demonchy, R., Blisnick, T., Deprez, C., Toutirais, G., Loussert, C., Marande, W., Grellier, P., Bastin, P., and Kohl, L. (2009) Kinesin 9 family members perform separate functions in the trypanosome flagellum. *J. Cell Biol.* **187**, 615–622
- Cornfine, S., Himmel, M., Kopp, P., El Azzouzi, K., Wiesner, C., Kruger, M., Rudel, T., and Linder, S. (2011) The kinesin KIF9 and reggie/flotillin proteins regulate matrix degradation by macrophage podosomes. *Mol. Biol. Cell* **22**, 202–215
- Tikhonenko, I., Nag, D. K., Robinson, D. N., and Koonce, M. P. (2009) Microtubule-nucleus interactions in *Dictyostelium discoideum* mediated by central motor kinesins. *Eukaryot. Cell* **8**, 723–731
- Jang, C. Y., Wong, J., Coppinger, J. A., Seki, A., Yates, J.R. 3rd, and Fang, G. (2008) DDA3 recruits microtubule depolymerase Kif2a to spindle poles and controls spindle dynamics and mitotic chromosome movement. *J. Cell Biol.* **181**, 255–267
- Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapère, J. J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I., and Goud, B. (1998) Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* **279**, 580–585
- Tsai, M. Y., Wiese, C., Cao, K., Martin, O., Donovan, P., Ruderman, J., Prigent, C., and Zheng, Y. (2003) A Ran signaling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nat. Cell Biol.* **5**, 242–248
- Zhu, J., Bilan, P. J., Moyers, J. S., Antonetti, D. A., and Kahn, C. R. (1996) Rad, a novel Ras-related GTPase, interacts with skeletal muscle beta-tropomyosin. *J. Biol. Chem.* **271**, 768–773
- Zhu, M., Wang, F., Yan, F., Yao, P. Y., Du, J., Gao, X., Wang, X., Wu, Q., Ward, T., Li, J., Kioko, S., Hu, R., Xie, W., Ding, X., and Yao, X. (2008) Septin 7 interacts with centromere-associated protein E and is required for its kinetochore localization. *J. Biol. Chem.* **283**, 18916–18925

Received for publication June 1, 2012.
Accepted for publication August 20, 2012.

Résumé des travaux de thèse

La division cellulaire est cruciale pour le maintien de la stabilité du génome. Or, les gènes régulateurs de la mitose sont fréquemment mutés dans le cancer. Les cellules cancéreuses possèdent généralement un nombre anormal de chromosomes et la majorité des tumeurs solides sont aneuploïdes. Cette caractéristique favorise notamment l'initiation et la progression tumorale mais constitue également un facteur de mauvais pronostic et de résistance thérapeutique. La voie sphingosine kinases/sphingosine 1-phosphate (SphKs/S1P) régule la prolifération et la survie cellulaire, l'apoptose, la migration ou encore la réponse inflammatoire. De nombreuses études ont montré que sa surexpression favorise l'initiation et la progression tumorale mais également l'invasion, le processus métastatique et l'acquisition de résistance à la thérapie.

Mon projet de thèse vise à mettre à évidence le rôle de la voie SphKs/S1P dans la régulation de la mitose et de la ségrégation chromosomique. Nos résultats montrent pour la première fois que les SphKs contrôlent la progression mitotique. Cette régulation implique la production de S1P et son interaction avec son récepteur couplé aux protéines G, le S1P₅. La surexpression des SphKs ou la surproduction de S1P altèrent la ségrégation des chromosomes. De plus, nos données récentes suggèrent que la voie SphKs/S1P puisse être impliquée dans l'acquisition de résistance aux agents de chimiothérapie ciblant la mitose.

Nous montrons pour la première fois que la voie SphKs/S1P est un nouveau régulateur de la mitose. Ces travaux permettent de mieux comprendre comment la voie SphKs/S1P contribue au développement tumoral et renforcent leur intérêt comme cible thérapeutique dans le traitement du cancer.