

## La voie sphingomyéline-céramide dans la réponse cellulaire aux effecteurs antitumoraux

Thierry Levade  
Jean-Pierre Jaffrézou  
Nathalie Andrieu  
Guy Laurent

Certaines cytokines, des agents différenciateurs, ou des effecteurs antitumoraux activent une voie de transmission du signal intracellulaire caractérisée par l'hydrolyse de la sphingomyéline et la production de céramide sous l'effet de sphingomyélinases. Le céramide exerce des effets biologiques variables (prolifération, apoptose, ou différenciation) selon le modèle cellulaire et la nature de l'agent agoniste. Cette voie apparaît précisément réglée, en amont de la production de céramide, par la quantité de sphingomyéline hydrolysable et l'inductibilité de la sphingomyélinase ; en aval, par l'activité de certaines protéine kinases, la concentration intracellulaire de diacylglycérol, des produits d'oncogènes tels que c-Jun et Bcl-2 et la capacité fonctionnelle de facteurs transcriptionnels tels que NF- $\kappa$ B et AP-1. L'effet cytotoxique des rayonnements ionisants, des anthracyclines, de l'aracytine ou de la vincristine, semble passer par cette voie dont toute altération métabolique ou génétique s'accompagne d'un phénotype de résistance.

### ADRESSES

T. Levade : directeur de recherche à l'Inserm. N. Andrieu : boursière MESR. CJF Inserm 92-06, régulations cellulaires et maladies métaboliques, Institut Louis-Bugnard, CHU Rangueil, 31054 Toulouse, France. J.P. Jaffrézou : chargé de recherche au Cnrs. G. Laurent : professeur des Universités. CJF Inserm 95-03, modulation de la réponse des cellules hématopoïétiques aux agents antitumoraux, Centre Claudius Regaud, 20, rue du Pont-Saint-Pierre, 31052 Toulouse, France.

La sphingomyéline (SPM) et ses dérivés ont été longtemps considérés exclusivement comme des éléments structuraux des membranes des cellules eucaryotes. La mise en évidence de l'effet antagoniste de la sphingosine vis-à-vis de la protéine kinase C par le groupe d'Hannun en 1986, a constitué la première étape d'une série de travaux qui ont identifié le rôle des sphingolipides en tant que seconds messagers. Par analogie avec le cycle des phosphatidylinositols, a

été découvert le « cycle », ou la « voie », de la SPM qui engendre, en réponse à un nombre croissant d'agonistes naturels ou pharmacologiques, un médiateur lipidique, le céramide. Des travaux récents font état du rôle joué par le céramide dans la transmission de signaux activés par divers effecteurs et conduisant à des effets biologiques variés, voire opposés, tels que prolifération, différenciation ou mort cellulaire programmée (apoptose). L'essor de ce champ particulièrement vaste et

## RÉFÉRENCES

1. Kolesnick RN. Sphingomyelin and derivatives as cellular signals. *Prog Lipid Res* 1991; 30: 1-38.
2. Devaux P, Zachowski A. Maintenance and consequences of membrane phospholipid asymmetry. *Chem Phys Lipids* 1994; 73: 107-20.
3. Schuchman EH, Desnick RJ. Niemann-Pick disease types A and B: acid sphingomyelinase deficiencies. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7th ed. New York: McGraw Hill, 1995: 2601-24.
4. Levade T, Salvayre R, Douste-Blazy L. Sphingomyelinases and Niemann-Pick disease. *J Chem Clin Biochem* 1986; 24: 205-20.
5. Tamiya-Koizumi K, Umekawa H, Yoshida S, Kojima K. Existence of Mg<sup>2+</sup>-dependent, neutral sphingomyelinase in nuclei of rat ascites hepatoma cells. *J Biochem* 1989; 106: 593-8.
6. Okazaki T, Bielawska A, Domae N, Bell RM, Hannun YA. Characteristics and partial purification of a novel cytosolic, magnesium-independent, neutral sphingomyelinase activated in early signal transduction of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced HL-60 cell differentiation. *J Biol Chem* 1994; 269: 4070-7.
7. Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA. Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 1993; 259: 1769-71.
8. Wiegmann K, Schütze S, Machleidt T, Witte D, Krönke M. Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 1994; 78: 1005-15.
9. Andrieu N, Salvayre R, Levade T. Evidence against the involvement of the acid lysosomal sphingomyelinase in the tumor necrosis factor- and interleukin-1-induced sphingomyelin cycle and cell proliferation in human fibroblasts. *Biochem J* 1994; 303: 341-5.
10. Andrieu N, Salvayre R, Jaffrézou JP, Levade T. Low temperatures and hypertonicity do not block cytokine-induced stimulation of the sphingomyelin pathway but inhibit nuclear factor- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem* 1995; 270: 24518-24.
11. Wright SC, Zheng H, Zhong J. Tumor cell resistance to apoptosis due to a defect in the activation of sphingomyelinase and the 24 kDa apoptotic protease (AP24). *FASEB J* 1996; 10: 325-32.
12. Linardic CM, Hannun YA. Identification of a distinct pool of sphingomyelin involved in the sphingomyelin cycle. *J Biol Chem* 1994; 269: 23530-7.
13. Andrieu N, Salvayre R, Levade T. Comparative study of the metabolic pools of sphingomyelin and phosphatidylcholine sensitive to tumor necrosis factor. *Eur J Biochem* 1996; 236: 738-45.

complexe est en partie lié à l'implication de ces voies de transmission du signal dans le mécanisme de cytotoxicité de diverses classes d'agents antitumoraux; ceux-ci incluent non seulement des effecteurs naturels tels que le TNF $\alpha$  ou Fas/Apo-1 mais aussi des médicaments anticancéreux, des agents différenciateurs et les rayonnements ionisants. De plus, il apparaît de plus en plus clairement que ces voies de transmission du signal sont réglées par de nombreux paramètres représentant ainsi autant de facteurs susceptibles de diminuer significativement l'efficacité de nombreux agents utilisés dans le traitement des tumeurs. En conséquence, si ce domaine d'investigation apparaît novateur dans le domaine de la biologie cellulaire, il concerne aussi, et sans doute au premier plan, la pharmacologie antitumorale et ouvre de nouvelles approches dans l'amélioration des performances cytotoxiques des traitements chimio-radiothérapeutiques.

## Métabolisme de la sphingomyéline

La sphingomyéline (SPM), ou N-acylsphingosine-1-phosphocholine, appartient au groupe complexe des sphingolipides, lipides dont la structure de base est le céramide [1] (figure 1). La SPM représente un des principaux constituants phospholipidiques des membranes et, notamment, de la membrane plasmique. La SPM est préférentiellement distribuée dans le feuillet externe de la membrane; inversement, les aminophospholipides (phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine) sont plutôt représentés sur le feuillet interne [2]. La SPM est synthétisée dans l'appareil de Golgi à partir du céramide par transfert direct du groupement phosphocholine provenant des phosphatidylcholines qui produisent ainsi des diacylglycérols (DAG) [1]. Cette synthèse est sous le contrôle d'une SPM synthase susceptible de contrôler ainsi les concentrations de deux médiateurs lipidiques, le céramide et le DAG. L'hydrolyse de la SPM est catalysée par des sphingomyélinases (SPMases) qui libèrent de la phosphocholine et du céramide. A son tour, le céramide est dégradé par des céramidases en acide gras et

sphingosine, elle-même hydrolysée après avoir engendré de la sphingosine-1-phosphate [1]. Plusieurs SPMases ont été décrites, le rôle de certaines demeurant très hypothétique. La SPMase la mieux connue, la SPMase acide, est une hydrolase lysosomale, ubiquitaire, ayant un pH optimum voisin de 5 [3, 4]. Dans certains tissus, en particulier dans le système nerveux, existe une autre SPMase, la SPMase neutre, de pH optimum proche de 7 et dont l'activité dépend des ions Mg<sup>2+</sup> ou Mn<sup>2+</sup> [4]. Cette enzyme, mal connue, semble être liée au feuillet externe de la membrane plasmique. D'autres SPMases ont été décrites. Outre une SPMase sérique, il existerait une SPMase neutre, dépendante du Mg<sup>2+</sup> et du dithiothréitol, en partie nucléaire [5] et une SPMase neutre, indépendante du Mg<sup>2+</sup>, cytosolique [6].

De nombreux travaux récents font état de la stimulation de l'activité SPMasique responsable de l'hydrolyse de la SPM et de la génération concomitante de céramide sous l'effet d'agents de nature diverse (Tableau I). Cette revue est consacrée aux effets biologiques de l'activation de l'hydrolyse de la SPM en céramide sous l'influence de ses divers agonistes. Par simplification, la cascade des événements placés en amont ou en aval de la génération de céramide sera décrite sous le terme de «voie SPM-céramide».

## La voie SPM-céramide dans les effets biologiques du TNF $\alpha$

Le TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) est une cytokine dont les effets sont pléiomorphes en fonction des systèmes cellulaires. Ainsi, le TNF $\alpha$  peut induire, selon le modèle, des effets biologiques aussi différents que prolifération, différenciation ou cytotoxicité. Par exemple, le TNF $\alpha$  active un phénomène d'apoptose dans les cellules leucémiques myéloïdes U937 et HL-60; dans ces cellules, le TNF $\alpha$  induit un cycle de la SPM (hydrolyse et resynthèse) avec production concomitante de céramide (*m/s n° 6-7, vol. 9, p. 813*) [7]. Dans ce processus, l'hydrolyse de la SPM est assurée par la stimulation d'une SPMase dont la nature est

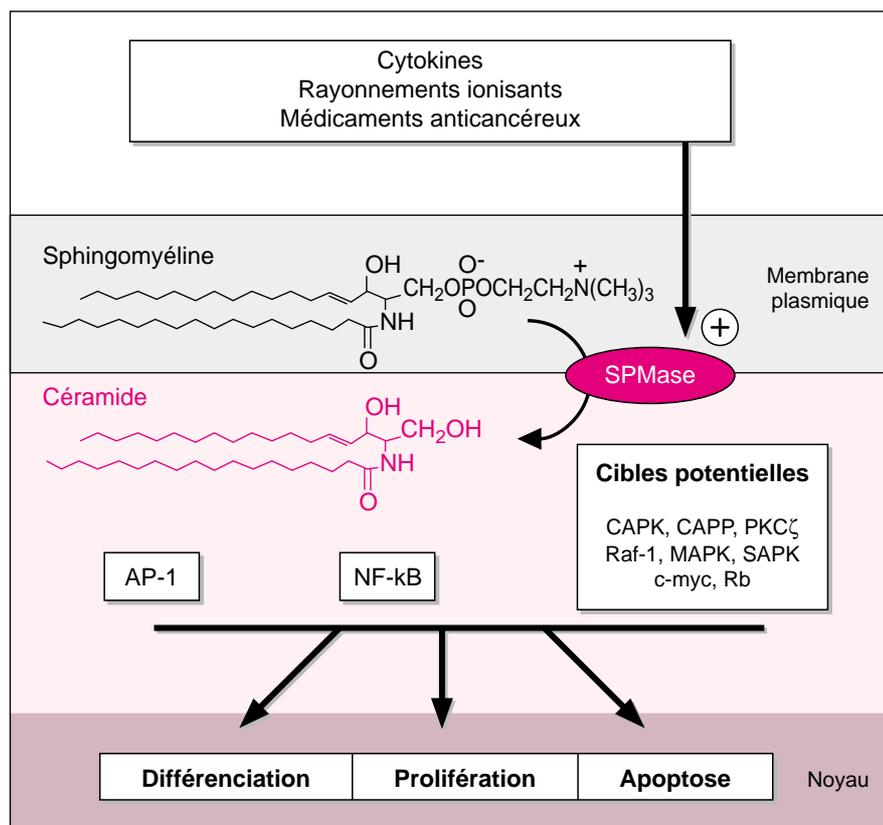


Figure 1. **Voie de transmission du signal « sphingomyéline-céramide ».** L'activation de la sphingomyélinase par un grand nombre d'agonistes permet, par hydrolyse de la sphingomyéline, l'accumulation d'un second messager lipidique, le céramide. Les cibles potentielles du céramide diffèrent selon le type cellulaire : l'activation de CAPK et MAPK est associée à des signaux prolifératifs et de différenciation, celle de JNK/SAPK à des signaux apoptotiques. Le céramide active aussi des facteurs transcriptionnels (AP1, NFκB) impliqués dans l'apoptose. SPMase : sphingomyélinase ; CAPK, ceramide activated protein kinase ; CAPP, ceramide activated protein phosphatase ; PKC, protéine kinase C ; MAPK, mitogen activated protein kinase ; JNK/SAPK, c-jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase ; Rb, produit du gène de susceptibilité au rétinoblastome.

controversée : SPMase acide et/ou neutre membranaire [8]. Cependant, l'implication d'une SPMase endolysosomale semble improbable [9]. Dans cette transmission du signal, le céramide apparaît bien comme le second messager impliqué dans le phénomène d'apoptose (*m/s n° 5, vol. 12, p. 658*) puisque l'exposition des cellules à des céramides rendus perméants par un raccourcissement de la chaîne carbonée (C2- ou C6-céramide) ou encore le traitement des cellules par une SPMase bactérienne miment ce phénomène [7]. Dans un travail antérieur réalisé

dans les cellules U937, nous avons montré que l'hydrolyse de la SPM sous l'effet du TNFα est conservée dans des conditions où l'endocytose est inhibée, suggérant que l'internalisation du couple ligand-récepteur n'est pas nécessaire à l'activation de la voie SPM-céramide, et que l'hydrolyse de la SPM a lieu dans ou très près de la membrane plasmique [10]. L'implication d'une SPMase dans la transmission du signal activé par le TNFα est renforcée par une étude récente démontrant que, dans des cellules variantes de la lignée U937 et résistantes au TNFα (clone

U9-TR), cette cytokine est inapte à stimuler l'activité SPMasique, à activer l'hydrolyse de la SPM, à provoquer la production du céramide et à induire un phénomène d'apoptose [11]. Toutefois, il convient de noter qu'il ne s'agit là que d'arguments indirects ; seuls des inhibiteurs spécifiques de la (ou des) SPMase(s) concernée(s) permettraient de confirmer sans équivoque le rôle central du céramide endogène engendré par l'hydrolyse de la SPM dans le processus de cytotoxicité induit par le TNFα. Il est important de souligner que l'hydrolyse de la SPM induite par le TNFα concerne essentiellement le *pool* de SPM associé au feuillet interne de la membrane plasmique [12, 13]. Dans un travail récent, nous avons mis en évidence des altérations de cette voie de transmission dans des cellules leucémiques myéloïdes naturellement résistantes au TNFα telles que la lignée KG1a. Dans cette lignée, contrairement à ce que nous avons observé dans la lignée sensible U937, le TNFα est inapte à activer une hydrolyse de la SPM et à provoquer la production du céramide [14]. Ces cellules étant très sensibles aux céramides exogènes, cette observation suggère que leur résistance naturelle au TNFα est bien liée à l'absence de génération de céramide. En théorie, l'absence de génération de céramide peut être en rapport, soit avec un défaut d'activation de la SPMase, soit avec un déficit du *pool* hydrolysable contenu dans le feuillet interne. De fait, nous avons mis en évidence, dans les cellules résistantes KG1a, une ségrégation transverse de la SPM très différente de celle retrouvée dans la lignée sensible U937, la SPM étant presque exclusivement distribuée au profit du feuillet externe avec un déficit relatif du *pool* associé au feuillet interne [14]. Ainsi, la distribution de la SPM jouerait un rôle important dans la protection vis-à-vis du TNFα en contrôlant les étapes précoces de la voie SPM-céramide. Par ailleurs, l'activation de la voie SPM-céramide sous l'effet du TNFα peut conduire dans d'autres systèmes cellulaires à des effets opposés et, par exemple, à un signal mitogénique. Il en est ainsi dans les fibroblastes [9]. Cette observation démontre que, si le céramide joue un rôle de second

## RÉFÉRENCES

14. Bettaieb A, Record M, Côme MG, Bras AC, Chap H, Laurent G, Jaffrèzou JP. Opposite effects of TNF $\alpha$  on the sphingomyelin-ceramide pathway in two myeloid leukemia cell lines: role of transverse sphingomyelin distribution in the plasma membrane. *Blood* 1996; 88: 1465-72.

15. Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, Persaud RS, McLoughlin M, Fuks Z, Kolesnick R. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med* 1994; 180: 525-35.

16. Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, Birrer MJ, Szabo E, Zon LI, Kyriakis JM, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick RN. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 1996; 380: 75-9.

17. Quillet-Mary A, Mansat V, Duchayne E, Côme MG, Allouche M, Bailly JD, Bordier C, Laurent G. Daunorubicin-induced internucleosomal DNA fragmentation in acute myeloid cells. *Leukemia* 1995; 10: 417-25.

18. Jaffrèzou JP, Levade T, Bettaieb A, Andrieu N, Bezombes C, Maestre N, Vermeersch S, Rouse A, Laurent G. Daunorubicin-induced apoptosis: triggering of ceramide generation through sphingomyelin hydrolysis. *EMBO J* 1996; 15: 2417-24.

19. Bose R, Verheij M, Haimovitz-Friedman A, Scotto K, Fuks Z, Kolesnick RN. Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signal. *Cell* 1995; 82: 405-14.

20. Strum JC, Small GW, Pauig SB, Daniel LW. 1- $\beta$ -D-Arabinofuranosylcytosine stimulates ceramide and diglyceride formation in HL-60 cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 15493-7.

21. Zhang J, Alter N, Reed JC, Borner C, Obeid LM, Hannun YA. Bcl-2 interrupts the ceramide-mediated pathway of cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5325-8.

22. Golstein P. Deux mécanismes moléculaires pour la cytotoxicité T: perforine/granzymes et Fas. *médecine/sciences* 1995; 11: 99-104.

23. Gill BM, Nishikata H, Chan G, Delovitch TL, Ochi A. Fas antigen and sphingomyelin-ceramide turnover-mediated signaling: role in life and death of T-lymphocytes. *Immunol Rev* 1994; 142: 113-25.

24. Cifone MC, De Maria R, Roncaioli P, Rippo MR, Azuma LLM, Lanier LL, Santoni A, Testi R. Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. *J Exp Med* 1994; 177: 1547-52.

25. Tepper CG, Jayadev S, Liu B, Bielawska A, Wolff R, Yonehara S, Hannun YA, Seldin MF. Role of ceramide as an endogenous mediator of Fas-induced cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8443-7.

26. Riboni L, Prinetti A, Bassi R, Caminiti A, Tettamanti G. A mediator role of ceramide in the regulation of neuroblastoma Neuro2a cell differentiation. *J Biol Chem* 1995; 270: 26868-75.

messager, la nature des signaux mis en jeu en aval de sa production oriente la réponse cellulaire vers un signal apoptotique ou prolifératif. L'implication du céramide dans le relais d'un effet mitogénique n'est pas restreinte à la seule transmission du signal du TNF $\alpha$  dans les fibroblastes. En effet, des travaux plus récents impliquent le céramide comme médiateur de la prolifération cellulaire induite par des anticorps anti-CD28 ou des lipoprotéines oxydées (Tableau I).

### **La voie SPM-céramide dans les effets biologiques des radiations**

Haimovitz-Friedman *et al.* ont montré que les rayonnements ionisants (RI) induisent dans des cellules endothéliales bovines un cycle de la SPM avec libération de céramide et mort par apoptose [15]. L'hydrolyse de la SPM par les RI a été aussi observée dans les surnageants post-nucléaires irradiés, suggérant donc que les lésions de l'ADN ne sont pas nécessaires à l'activation de la voie SPM-céramide. Plus récemment, nous avons observé dans une série de lignées leucémiques myéloïdes une corrélation étroite entre, d'une part, l'aptitude des RI à induire une hydrolyse de la SPM et un phénomène d'apoptose et, d'autre part, le niveau de radiosensibilité. Il est à noter que ces lignées synthétisent une protéine p53 mutée, suggérant que le phénomène d'apoptose induit par les rayonnements et relayé par le céramide est indépendant du statut de la p53 (résultats personnels). En définitive, il apparaît que les RI pourraient exercer leur capacité cytotoxique à partir de signaux débutant à la membrane, indépendamment des lésions de l'ADN provoquées par les radicaux oxygénés. Les rayonnements ultraviolets sont également capables d'activer cette voie de transmission du signal [11, 16].

### **La voie SPM-céramide dans la cytotoxicité des agents antitumoraux**

La daunorubicine (DNR), une anthracycline largement utilisée dans le traitement des leucémies aiguës

myéloïdes, engendre un phénomène d'apoptose dans les lignées HL-60 et U937 à des concentrations compatibles avec son utilisation clinique [17]. Dans un travail récent, nous avons montré que, dans les mêmes conditions, la DNR induit un cycle précoce de la SPM ainsi que l'activation d'une SPMase neutre à des temps correspondant à l'hydrolyse de la SPM [18].

L'origine du céramide n'est probablement pas univoque puisque, dans d'autres conditions d'exposition à la DNR, sa génération serait en rapport avec une activation de sa biosynthèse [19]. L'originalité de ces observations réside dans le fait que, jusqu'à ce jour, le mécanisme de cytotoxicité des anthracyclines était supposé impliquer leurs interactions avec l'ADN et, notamment, avec la topoisomérase II $\alpha$  nucléaire. Ainsi donc, comme pour les RI, il semble qu'un médicament anticancéreux puisse exercer son effet cytotoxique par l'intermédiaire d'une cascade d'événements activée par l'hydrolyse de la SPM.

Dans le cas de la DNR, il reste toutefois à évaluer si cette voie de transmission du signal est activée indépendamment de l'interaction avec le noyau ou, au contraire, constitue une réponse aux lésions provoquées sur l'ADN.

De plus, nous avons observé, comme pour le TNF $\alpha$ , que dans des cellules naturellement résistantes à la DNR, cet agent n'active pas la production de céramide, ces cellules restant très sensibles au céramide exogène. Ces résultats suggèrent que la non-inductibilité du phénomène d'apoptose dans les cellules résistantes est bien liée à l'absence de génération de céramide après exposition à la DNR. Comme la DNR, l'aracytine et la vincristine, deux autres agents antileucémiques, sont capables d'induire la production de céramide [20, 21].

### **La voie SPM-céramide dans l'apoptose relayée par Fas/Apo-1**

Dans la mesure où le système Fas/Fasligand apparaît comme une interaction potentiellement importante dans le mécanisme de lymphocytotoxicité, certains auteurs ont évalué l'implication de la voie SPM-céramide dans la

Tableau I  
AGENTS STIMULANT LA VOIE SPM-CÉRAMIDE

Effecteur (concentration)	Cellules testées	Effet observé	Références
Vitamine D3 (100 nM)	HL-60	Différenciation	[6, 39, 40]
Interféron $\gamma$ (100 U/ml)	HL-60	Différenciation	
TNF $\alpha$ (0,1-30 nM)	HL-60	Différenciation	[8, 41, 43]
	Jurkat	Arrêt de la croissance	[44]
	U937	Apoptose	[7]
IL-1 $\beta$ (0,05-10 ng/ml)	Fibroblastes	Prolifération	[9]
	Fibroblastes	Production de PGE2	[45]
		Prolifération	[9]
	EL4 (thymome)	Sécrétion d'IL2	[46]
	Hépatocytes	Rétrocontrôle de P450	[47]
NGF ( <i>nerve growth factor</i> )	T9 gliome	Différenciation	[48]
Anti-CD28	Cellules T	Prolifération	[49]
	Jurkat	Prolifération	[50]
Anti-Fas	U937	Apoptose	[23]
	Jurkat	Apoptose	[24]
	Hut78	Apoptose	[51]
	EBV-LCL	Apoptose	[25]
Radiations UV	U937	Apoptose	[11, 16]
	BAEC	Apoptose	[16]
Radiations ionisantes	BAEC	Apoptose	[15]
Complément	EBV-LCL		[52]
Acide rétinoïque	Neuro2a	Différenciation	[26]
Daunorubicine (1 $\mu$ M)	P388	Apoptose	[19]
	U937	Apoptose	[18]
	HL-60	Apoptose	[18]
Vincristine (1 $\mu$ M)	ALL-697	Apoptose	[21]
Privation de sérum	Molt-4	Arrêt du cycle cellulaire	[53]
Bréfeldine A	HL-60		[54]
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 mM)	U937	Apoptose	[16]
Chaleur (45 °C)	U937	Apoptose	[16]
LDL oxydées (100 $\mu$ g/ml)	BSMC	Prolifération	[55]

EBV-LCL : Epstein-Barr virus-transformed lymphoid cell lines ; BAEC : bovine aortic endothelial cells ; bsmc : bovine smooth muscle cells ; HL60 : cellules humaines dérivées d'une leucémie à promyélocytes ; Jurkat : lignée humaine T ; ALL-697 : cellules de leucémie aiguë lymphoblastique ; U937 : cellules leucémiques myéloïdes ; Hut78 : lignée cellulaire T lymphomateuse ; P388 : lignée cellulaire leucémique murine ; Molt-4 : lignée cellulaire leucémique T.

transmission du signal relayée par Fas. Fas (Apo-1, CD95) appartient à la superfamille des récepteurs du NGF et du TNF (*m/s n° 2, vol. 10, p. 234*). Cette protéine est susceptible d'activer un phénomène d'apoptose quand elle est reconnue par un anticorps spécifique ou par son ligand naturel [22].

Plusieurs travaux récents montrent l'activation de la voie SPM-céramide dans l'apoptose induite par des anticorps anti-Fas [23-25]. Cette transmission du signal paraît critique dans l'apoptose relayée par Fas. En effet, dans une lignée de lymphome de Burkitt résistante à un anticorps anti-Fas, cet agoniste n'induit ni activité SPMasique ni production de céra-

mide [25]. Toutefois, la nature de la SPMase activée par Fas est discutée : acide [24] ou neutre [25].

### La voie SPM-céramide dans les effets biologiques des agents différenciateurs

Les effecteurs cytotoxiques, naturels ou pharmacologiques, ne sont pas les seuls agents antitumoraux à relayer leurs effets en empruntant cette voie de transmission du signal. Au moins dans certains systèmes cellulaires, des agents différenciateurs sont capables d'activer la production de céramide. Ainsi, dans une lignée HL-60, l'exposition des cellules à la vitamine D<sub>3</sub>

conduit à un cycle de SPM parallèle à l'induction d'un processus de différenciation monocyttaire [6].

De façon similaire, dans des cellules de neuroblastome exposées à l'acide rétinoïque, Riboni *et al.* montrent une élévation du taux de céramide relativement lente, progressive et réversible. Dans ce phénomène, au moins deux voies métaboliques sont impliquées : d'une part une dégradation de la SPM, d'autre part une synthèse *de novo* de céramide. Enfin, dans ces cellules, un céramide perméant ou le traitement par la SPMase bactérienne inhibe la prolifération et stimule la différenciation [26]. Ces résultats montrent que, dans certains systèmes cellulaires, l'activation de la

## RÉFÉRENCES

27. Ohta H, Yatomi Y, Sweeney EA, Hakomori S, Igarashi Y. A possible rôle of sphingosine in induction of apoptosis by tumor necrosis factor- $\alpha$  in human neutrophils. *FEBS Lett* 1994; 355: 267-70.
28. Mathias S, Dressler KA, Kolesnick RN. Characterization of a ceramide-activated protein kinase: stimulation by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10009-13.
29. Yao B, Zhang Y, Delikat S, Mathias S, Basu S, Kolesnick RN. Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase. *Nature* 1995; 378: 307-10.
30. Kahn A. La transmission du signal en amont et en aval de Ras. *médecine/sciences* 1992; 8: 1097-9.
31. Dobrowsky RT, Hannun YA. Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase. *J Biol Chem* 1992; 267: 5048-51.
32. Sawai H, Okasaki T, Yamamoto H, Okano H, Takeda Y, Tashima M, Sawada H, Okuma M, Ishikura H, Umehara H, Domae N. Requirement of AP-1 for ceramide-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 27326-31.
33. Lozano J, Berra E, Muncio MM, Diaz-Meco MT, Dominguez I, Sanz L, Moscat J. Protein kinase C  $\zeta$  isoform is critical for  $\kappa$ B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J Biol Chem* 1994; 269: 19200-2.
34. Higuchi M, Singh S, Jaffrézou JP, Aggarwal BB. Acid sphingomyelinase-generated ceramide is needed but not sufficient for tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Immunol* 1996; 157: 297-304.
35. Martin SJ, Takayama S, McGahon AJ, Miyashita T, Corbeil J, Kolesnick RN, Reed JC, Green DR. Inhibition of ceramide-induced apoptosis by Bcl-2. *Cell Death Diff* 1995; 26: 253-7.
36. Allouche M, Beltaieb A, Vindis C, Rouse A, Laurent G. Daunorubicin-induced apoptosis of leukemic cells: Bcl-2-mediated protection is effected downstream of the sphingomyelin-ceramide pathway. *Oncogene* 1996 (sous presse).
37. Jarvis WDJ, Fornari FA, Browning JL, Gewirtz DA, Kolesnick RN, Grant SG. Attenuation of ceramide-induced apoptosis by diglyceride in human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 31685-92.
38. Kolesnick R, Fuks ZJ. Ceramide: a signal for apoptosis or mitogenesis. *J Exp Med* 1995; 181: 1949-52.
39. Okazaki T, Bell RM, Hannun YA. Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. Role in cell differentiation. *J Biol Chem* 1989; 264: 19076-80.
40. Okazaki T, Bielawska A, Bell RM, Hannun YA. Role of ceramide as a lipid mediator of 1  $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cell differentiation. *J Biol Chem* 1990; 265: 15823-31.

voie SPM-céramide ne conduit ni à un processus d'apoptose comme systématiquement dans la lignée U937 ou les cellules endothéliales, ni à un signal mitogène comme dans les fibroblastes, mais à l'activation d'un programme de différenciation.

### Rôle des autres métabolites de la SPM dans l'apoptose

L'implication du céramide dans l'ensemble des processus décrits ci-dessus soulève le rôle potentiel de son métabolite direct, la sphingosine. Dans la mesure où les céramides synthétiques perméants sont, d'une part, capables de mimer les effets du céramide endogène et, d'autre part, ne sont pas convertis en sphingosine ou en sphingosine-1-phosphate, il est probable que la sphingosine ne joue aucun rôle dans les effets biologiques de l'activation de la voie SPM-céramide. Cependant, certains travaux suggèrent que la sphingosine peut être également considérée comme un second messenger impliqué dans le contrôle du processus apoptotique. En effet, le taux intracellulaire de sphingosine s'élève dans l'apoptose induite par le TNF $\alpha$  dans les neutrophiles et l'exposition de ces cellules à la sphingosine induit un phénomène d'apoptose [27].

### Les cibles du céramide

Le céramide étant un second messenger multifonctionnel dont les effets biologiques varient considérablement selon le modèle cellulaire et l'effecteur, il est rapidement apparu que les cibles du céramide devaient être multiples et que de la nature de celles-ci dépendait en grande partie l'effet biologique. De fait, une série d'études a permis d'identifier plusieurs cibles critiques de nature diverse (Tableau II). Toutefois, l'extrême complexité des mécanismes mis en jeu par le céramide rend encore confus le rôle respectif joué par ces effecteurs dans la cascade d'événements situés en aval de la génération de céramide. Le céramide active une sérine-thréonine protéine kinase (*ceramide-activated protein kinase* ou CAPK). CAPK est une protéine membranaire reconnaissant comme substrat le motif

minimal Thr-Leu-Pro [28]. Le rôle de CAPK reste discuté. Pour certains auteurs, l'activation de CAPK est responsable de l'activation de MAP kinases (*mitogen-activated protein kinases*) au terme d'une cascade impliquant la phosphorylation de Raf-1 sur le site thréonine 269, l'activation de Raf-1, et l'activation de MEK1, une MAP kinase-kinase [29]. Les MAP kinases représentent une classe de sérine-thréonine kinases dont l'activation est classiquement associée à des signaux prolifératifs et, éventuellement, à des processus de différenciation [30]. De fait, l'apoptose induite dans les cellules U937 par le céramide n'est pas affectée par des mutants négatifs de Raf-1 et MEK1 dans lesquels MAPK n'est pas activée [16]. Ainsi, l'activation de la voie CAPK-MAPK n'est peut-être pas impliquée dans l'effet apoptotique du céramide; en revanche, cette voie pourrait rendre compte des processus de prolifération et/ou de différenciation engagés par le céramide dans des systèmes cellulaires tels que les fibroblastes et certaines lignées HL-60.

Le céramide active une autre famille de kinases: les JNK (*c-Jun N-terminal kinase*)/SAPK (*stress-activated protein kinase*) [16]. Le céramide active ces kinases dans des systèmes cellulaires où il induit sans équivoque un phénomène d'apoptose, tels que la lignée U937 et les cellules endothéliales bovines. Cette cascade implique l'activation séquentielle de MEKK1, SEK1, SAPK et c-Jun [16]. L'utilisation d'un mutant dominant négatif de SEK1 bloque l'apoptose induite par le céramide. Ces résultats suggèrent que l'activation de SAPK serait critique dans l'activation du processus d'apoptose. Il semble donc exister une dualité entre les voies MAPK (prolifération/différenciation) et SAPK (apoptose) dans la transmission du signal induite par le céramide, sans que l'on sache si l'orientation de celle-ci vers l'une ou l'autre des deux voies est spécifique du modèle cellulaire ou si les deux voies peuvent coopérer dans la même cellule. Le céramide active aussi une protéine-phosphatase de la famille PP2A (*ceramide-activated protein phosphatase* ou CAPP) inhibée par l'acide okadaïque et dont la fonction reste à élucider [31].

Tableau II  
CIBLES CELLULAIRES DU CÉRAMIDE

Cible	Effet observé	Cellules testées	Références
CAPK	Activation	A431	[28]
CAPP	Activation	HL-60	[42]
		T9 gliome	[31]
PKC $\zeta$	Activation	NIH 3T3	[33]
		U937	[57]
Vav GEF	Stimulation	EL4	[58]
Ras	Activation	Jurkat	[59]
Raf-1 kinase	Phosphorylation + activation	70Z/3	[60]
MAPK (p42)	Activation	HL60	[29]
		HL-60	[61]
JNK/SAPK	Activation	HL-60	[62]
		U937	[16]
NF- $\kappa$ B	Translocation nucléaire	BAEC	[16]
		Jurkat	[43, 44]
AP-1	Activation	HL60	[63]
		HL-60	[32]
c-Myc	Rétrocontrôle	HL-60	[41]
Rb	Déphosphorylation	Molt-4	[64]
gène <i>Cox</i>	Production de PGE2	Fibroblastes	[45]
gène <i>IL6</i>	Production d'IL6	Fibroblastes	[65]
Cristalline $\alpha\beta$	Transcription	NIH 3T3	[66]

CAPK: ceramide activated protein kinase; CAPP: ceramide activated protein phosphatase; MAPK: mitogen activated protein kinase; JNK/SAPK: Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase; Rb: produit du gène de susceptibilité au rétinoblastome; BAEC: bovine aortic endothelial cells; Cox: cytochrome oxydase; A-431: lignée humaine dérivée de tumeur gastrique; NIH3T3: lignée fibroblastique murine; 70Z-3: lignée cellulaire murine leucémique pré-B.

Enfin, le céramide active certains facteurs transcriptionnels dont le rôle pourrait être critique dans l'induction du phénomène d'apoptose. Ainsi, le céramide active *c-jun* et l'introduction d'un mutant négatif bloque l'effet apoptotique du céramide [16]. L'implication de *c-jun* dans l'apoptose induite par le céramide était déjà suggérée par le fait que cet oncogène est surexprimé au cours de l'apoptose induite par les rayonnements ionisants, les UV, le TNF $\alpha$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ou la privation de sérum, autant de circonstances dans lesquelles une génération de céramide a été identifiée (Tableau I). Dans un travail récent, Sawai *et al.* montrent que l'apoptose relayée par le céramide est bloquée par la curcumine (un inhibiteur de l'activation d'AP-1) ou par des oligonucléotides antisens pour *c-jun* [32]. Par ailleurs, le céramide active NF- $\kappa$ B, un autre facteur transcriptionnel impliqué dans l'apoptose induite par le TNF $\alpha$  et les rayonnements ionisants (Tableau II). L'activation de NF- $\kappa$ B par le céramide pourrait impliquer

une isoforme particulière de la protéine kinase C (PKC- $\zeta$ ) [33]. Toutefois, l'implication directe de NF- $\kappa$ B dans l'apoptose induite par le céramide n'est pas formellement prouvée [34].

### Régulation des effets biologiques du céramide

Certains facteurs ont été identifiés comme capables de contrôler négativement les effets biologiques du céramide et, en particulier, son effet apoptotique. Ainsi, la protéine Bcl-2 bloque l'effet apoptotique des céramides perméants [21, 35]. Nous venons de montrer que la surexpression de Bcl-2, conférée par transfection stable, retardait l'apoptose induite par le céramide produit par hydrolyse de la SPM sous l'effet de la DNR [36]. Par ailleurs, l'effet apoptotique du céramide est bloqué par l'exposition des cellules à des agonistes de la protéine-kinase C tels que les esters de phorbol ou le DAG [37]. Cette observation revêt une importance considérable dans la mesure où

la plupart des agonistes de la voie SPM-céramide tels que le TNF $\alpha$  [10, 13], la DNR (résultats personnels), l'aracytine [20] sont également susceptibles d'activer la génération de DAG via l'activation de phospholipases C. Ainsi, ces inducteurs pourraient activer deux voies métaboliques parallèles mais dont les effets sont opposés: une voie délétère relayée par le céramide conduisant à l'inhibition de la prolifération et/ou à l'apoptose, et une voie protectrice (voire mitogénique) relayée par le DAG; de l'équilibre entre ces deux voies dépend l'effet biologique [38].

### Conclusion

Le céramide, produit par l'hydrolyse de la SPM, apparaît comme un second messager puissant capable de relayer les effets cyostatiques ou cytotoxiques de nombreux effecteurs antitumoraux. Cette voie de transmission du signal semble précisément réglée en amont et en aval de la production de céramide. On conçoit donc que la fonction de cette voie de transmission du signal peut être facilement altérée dans les cellules tumorales, soit par des signaux liés à l'environnement, soit par des modifications intrinsèques métaboliques et/ou phénotypiques, ces altérations étant susceptibles de constituer autant de mécanismes de résistance aux effecteurs antitumoraux ■

### Remerciements

Ces recherches ont bénéficié du soutien de l'Inserm, de l'Université Paul-Sabatier-Toulouse III, de l'ARC (2069, 3002, 6749), de la FNCLCC, de la Ligue Contre le Cancer et du Conseil Régional Midi-Pyrénées.

### TIRÉS À PART

G. Laurent.

## RÉFÉRENCES

41. Kim MY, Linardic C, Obeid L, Hannun Y. Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon. Specific role in cell differentiation. *J Biol Chem* 1991; 266: 484-9.
42. Dressler KA, Mathias S, Kolesnick RN. Tumor necrosis factor-alpha activates the sphingomyelin signal transduction pathway in a cell-free system. *Science* 1992; 255: 1715-8.
43. Schutze S, Potthoff K, Machleidt T, Berkovic D, Wiegmann K, Kronke M. TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced «acidic» sphingomyelin breakdown. *Cell* 1992; 71: 765-76.
44. Dbaibo GS, Obeid LM, Hannun YA. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) signal transduction through ceramide. Dissociation of growth inhibitory effects of TNF-alpha from activation of nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* 1993; 268: 17762-6.
45. Ballou LR, Chao CP, Holness MA, Barker SC, Raghov R. Interleukin-1-mediated PGE2 production and sphingomyelin metabolism. Evidence for the regulation of cyclooxygenase gene expression by sphingosine and ceramide. *J Biol Chem* 1992; 267: 20044-50.
46. Mathias S, Younes A, Kan CC, Orlow I, Joseph C, Kolesnick RN. Activation of the sphingomyelin signaling pathway in intact EL4 cells and in a cell-free system by IL-1 beta. *Science* 1993; 259: 519-22.
47. Chen J, Nikolova-Karakashian M, Merrill AH Jr, Morgan ET. Regulation of cytochrome P450 2C11 (CYP2C11) gene expression by interleukin-1, sphingomyelin hydrolysis, and ceramides in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1995; 270: 25233-8.
48. Dobrowsky RT, Kamibayashi C, Mumby MC, Hannun YA. Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 1993; 268: 15523-30.
49. Chan G, Ochi A. Sphingomyelin-ceramide turnover in CD28 costimulatory signaling. *Eur J Immunol* 1995; 25: 1999-2004.
50. Boucher LM, Wiegmann K, Futterer A, Pfeffer K, Machleidt T, Schutze S, Mak TW, Kronke M. CD28 signals through acidic sphingomyelinase [see comments]. *J Exp Med* 1995; 181: 2059-68.
51. Cifone MG, Roncaioli P, De Maria R, Camarda G, Santoni A, Ruberti G, Testi R. Multiple pathways originate at the Fas/APO-1 (CD95) receptor: sequential involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and acidic sphingomyelinase in the propagation of the apoptotic signal. *EMBO J* 1995; 14: 5859-68.
52. Niculescu F, Rus H, Shin S, Lang T, Shin ML. Generation of diacylglycerol and ceramide during homologous complement activation. *J Immunol* 1993; 150: 214-24.
53. Jayadev S, Liu B, Bielawska AE, Lee JY, Nazaire F, Pushkareva MY, Obeid LM, Hannun YA. Role for ceramide in cell cycle arrest. *J Biol Chem* 1995; 270: 2047-52.
54. Linardic CM, Jayadev S, Hannun YA, Brefeldin A promotes hydrolysis of sphingomyelin. *J Biol Chem* 1992; 267: 14909-11.
55. Augé N, Andrieu N, Nègre-Salvayre A, Thiers JC, Levade T, Salvayre R. The sphingomyelin-ceramide signaling pathway is involved in oxidized low density lipoprotein-induced cell proliferation. *J Biol Chem* 1996; 271: 19251-5.
56. Dobrowsky RT, Kamibayashi C, Mumby MC, Hannun YA. Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 1993; 268: 15523-30.
57. Muller G, Ayoub M, Storz P, Rennecke J, Fabbro D, Pfizenmaier K. PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J* 1995; 14: 1961-9.
58. Gulbins E, Coggeshall KM, Baier G, Telford D, Langlet C, Baier-Bitterlich G, Bonnefoy-Berard N, Burn P, Wittinghofer A, Altman A. Direct stimulation of Vav guanine nucleotide exchange activity for Ras by phorbol esters and diglycerides. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 4749-58.
59. Gulbins E, Bissonnette R, Mahboubi A, Martin S, Nishioka W, Brunner T, Baier G, Baier-Bitterlich G, Byrd C, Lang F, et al. FAS-induced apoptosis is mediated via a ceramide-initiated RAS signaling pathway. *Immunity* 1995; 2: 341-51.
60. Belka C, Wiegmann K, Adam D, Holland R, Neuloh M, Herrmann F, Kronke M, Brach MA. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha activates c-raf-1 kinase via the p55 TNF receptor engaging neutral sphingomyelinase. *EMBO J* 1995; 14: 1156-65.
61. Raines MA, Kolesnick RN, Golde DW. Sphingomyelinase and ceramide activate mitogen-activated protein kinase in myeloid HL-60 cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 14572-5.
62. Westwick JK, Bielawska AE, Dbaibo G, Hannun YA, Brenner DA. Ceramide activates the stress-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1995; 270: 22689-92.
63. Yang Z, Costanzo M, Golde DW, Kolesnick RN. Tumor necrosis factor activation of the sphingomyelin pathway signals nuclear factor kappa B translocation in intact HL-60 cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 20520-3.
64. Dbaibo GS, Pushkareva MY, Jayadev S, Schwarz JK, Horowitz JM, Obeid LM, Hannun YA. Retinoblastoma gene product as a downstream target for a ceramide-dependent pathway of growth arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1347-51.
65. Lauderkind SJ, Bielawska A, Raghov R, Hannun YA, Ballou LR. Ceramide induces interleukin 6 gene expression in human fibroblasts. *J Exp Med* 1995; 182: 599-604.
66. Chang Y, Abe A, Shayman JA. Ceramide formation during heat shock: a potential mediator of alpha B-crystallin transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 12275-9.

**m/s ANNIVERSAIRE EN VIDÉO-CASSETTES**

**Les conférences de la journée du 10<sup>e</sup> anniversaire de médecine/sciences du 16 mars 1995 sont disponibles sur vidéo-cassettes auprès de :**

**ASSOCIATION DIFFUSION DES CONNAISSANCES**  
2, avenue Léon-Bernard,  
35043 Rennes Cedex, France.



### ATTRIBUTION DU PRIX YVETTE MAYENT INSTITUT CURIE 1996

Le Prix Yvette Mayent - Institut Curie 1996 a été décerné le 10 octobre 1996, par le Conseil d'Administration de l'Institut Curie, à Monsieur le Professeur Hermann BUJARD\* (Centre de Biologie Moléculaire de l'Université de Heidelberg, Allemagne), pour la découverte d'une technique permettant d'activer ou d'inhiber de façon spécifique et contrôlable l'expression de gènes *in vitro* ou *in vivo*. Cette méthode ouvre la porte à des applications multiples dans de nombreux domaines et en particulier en cancérologie (action sur les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs, les gènes de contrôle de la division cellulaire...).

Le prix Yvette Mayent - Institut Curie 1996 a été attribué sur proposition d'un jury présidé par Monsieur Roger Monier et composé des membres du Conseil Scientifique de l'Institut Curie et de personnalités scientifiques extérieures.

Attribué grâce aux legs de Monsieur Pierre Mayent en hommage à son épouse Yvette Mayent, ce prix européen a pour but de récompenser un chercheur pour une découverte effectuée dans le domaine de la physique, de la biologie, de la chimie ou de l'épidémiologie, susceptible de contribuer à court, moyen ou long terme, à améliorer le diagnostic, le traitement ou la prévention du cancer.

Pour l'année 1996, son montant est de 1 000 000 FF

\* Directeur de la Recherche Biologique de la Roche (Suisse) de 1983 à 1985. Fondateur puis Directeur de 1986 à 1992 du Centre de Biologie Moléculaire (ZMBH, Allemagne)

**Contacts : Catherine Sautés, Catherine Goupillon, Delphine Fauquembergue**  
**Institut Curie, 26, rue d'Ulm,**  
**75248 Paris Cedex 05, France.**  
**Tél. : 01 44 32 40 63 - Fax 01 43 25 17 56**

## Summary

### The sphingomyelin-ceramide pathway in cellular response to antitumor agents

Recent studies demonstrate that cytokines, differentiating drugs, and antitumor agents trigger an intracellular signalling pathway characterized by sphingomyelinase activation, plasma membrane-associated sphingomyelin hydrolysis and subsequent ceramide generation (sphingomyelin-ceramide pathway). Ceramide, in turn, may induce various biological effects including proliferation, apoptosis, and differentiation, depending on the agonist and the cellular model. These findings may have important implications in cancer therapy since this signalling pathway is involved in the cytotoxicity mechanism of major antitumor agents such as ionizing radiations, anthracyclines, and aracytine (and likely many others). Furthermore, this signalling cascade appears to be efficiently regulated by several parameters at two distinct levels: (1) upstream of ceramide generation, by the content of hydrolysable sphingomyelin pool and the magnitude of sphingomyelinase activation; (2) downstream of ceramide generation, by protein kinase activities, diacylglycerol content, oncogenes products such as c-Jun and Bcl-2, and functional capacities of transcriptional factors such as NF- $\kappa$ B and AP-1. Therefore, it is conceivable that, in some tumor cells, this signalling cascade may be altered at different(s) level(s) in relation with metabolic or genotypic modifications, leading to drug and/or radiation resistance. Better knowledge of the molecular basis of drug/radiation-activated sphingomyelin-ceramide signalling pathway may offer promising perspectives for pharmacological manipulations to improve the cytotoxicity of anti-tumor agents.

