

UNIVERSITÉ DE NANTES

Faculté de Médecine

---

N° attribué par la bibliothèque

Année 2009

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

# Caractérisation et modulation des évènements initiaux contrôlant la mort radioinduite de l'endothélium microvasculaire

---

THÈSE DE DOCTORAT

École Doctorale Biologie-Santé  
Discipline : Sciences de la vie et de la santé  
Spécialité : Biologie cellulaire

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Colin NIAUDET**

*Le 03 novembre 2009, devant le jury ci-dessous*

<b>Président :</b>	Dr. Philippe JUIN	DR, INSERM, UMR 892 Nantes
<b>Rapporteurs :</b>	Pr. Claire RODRIGUEZ- LAFRASSE	PU/PH, Faculté de Médecine de Lyon Oncologue Radiothérapeute, Institut Gustave-Roussy, Villejuif
	Dr. Eric DEUTSCH	
<b>Examinatrice :</b>	Dr. Anne-Odile HUEBER	DR, Institut de Biologie du Développement et du Cancer, Nice

**Directeur de thèse :** Dr. François PARIS, CR1 INSERM

# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	9
I. Les thérapies anti-cancéreuses classiques .....	9
1) La Théorie de la Mutation Somatique, cadre actuel de l'explication des cancers.....	9
1. Les altérations du cycle : les oncogènes- la voie des facteurs de croissance.....	10
2. Les altérations couplées, apoptose et sénescence- les voies de protection .....	10
2) Des défauts formant la base des thérapies anticancéreuses classiques .....	11
1. La radiothérapie : .....	11
2. La chimiothérapie : .....	13
Les agents chimiothérapeutiques classiques : .....	13
Les thérapies ciblées : le bouleversement des années 80 .....	15
Un double succès emblématique pour les thérapies ciblées.....	15
Difficultés des développements thérapeutiques en oncologie : .....	16
II. L'interaction avec le microenvironnement : le rôle clé de la vascularisation tumorale.....	18
1) Le concept initial de l'angiogenèse comme facteur limitant de la croissance tumorale (Folkman).....	18
2) De l'angiogenèse embryonnaire à la vascularisation tumorale : .....	20
1. Les bases mécanistiques de l'angiogenèse physiologique .....	21
La vasculogenèse : .....	21
La formation et la migration des précurseurs.....	21
La formation du réseau vasculaire primitif : .....	22
Un contrôle global du VEGF : .....	22
L'angiogenèse : .....	23
Un modèle général d'hypoxie/perfusion : .....	23
Le système HIF : .....	23
Le contrôle du VEGF : .....	24
Le modèle de la vascularisation rétinienne : .....	24
La maturation des vaisseaux .....	26
Situation de départ .....	26
La mise en place de la matrice extracellulaire .....	26
Le recrutement des cellules mésenchymateuses .....	27
Interaction entre cellules endothéliales et péricytes : .....	29
La spécialisation vasculaire .....	31
3) La vascularisation tumorale : exploration et exploitation thérapeutique .....	32
1. Le modèle classique du switch angiogénique .....	32
Souris Rip/TAG et mise en évidence historique du switch angiogénique .....	32
La recherche de l'expression d'un facteur pro-angiogénique : le modèle MM16.....	33
Les étapes détaillées : les apports de la surexpression du VEGF A.....	33
2. Limites et alternatives au modèle classique du switch angiogénique .....	34
La première limite : les facteurs anti-angiogéniques.....	34
La deuxième limite : le retour de mécanismes d'induction éliminés par les premiers modèles murins.....	35
L'angiogenèse sous contrôle des oncogènes.....	35
La part de l'hypoxie .....	36

## Sommaire

La troisième limite : des mécanismes de vascularisation alternatifs.....	36
L'intervention des progéniteurs endothéliaux :.....	36
Holash et la cooptation .....	37
Des modèles généraux donc alternatifs ou valables localement ?.....	38
3. Les caractéristiques de la vascularisation tumorale.....	39
Caractéristiques cellulaires de la vascularisation tumorale et conséquences tissulaires.....	39
Les causes possibles : .....	40
Le surdosage du VEGF :.....	40
Les problèmes de maturation : .....	41
Les défauts de guidage vasculaire :.....	43
4) Une nouvelle approche thérapeutique ? Promesses et limites des thérapies anti-angiogéniques .....	43
1. La mise en pratique directe : bloquer l'angiogenèse .....	43
Des avantages théoriques importants .....	43
Les réussites cliniques .....	44
8 inhibiteurs de l'angiogenèse approuvés: .....	44
Les limites : la remise en cause des avantages théoriques, un développement rapide au détriment de la compréhension fine des mécanismes.....	45
Un nombre limité de validations cliniques :.....	45
Des cas de toxicité :.....	46
2. Des stratégies en cours de développement, visant la vascularisation tumorale établie : 47	
Les vasculotoxiques (Vascular Disruptive Agents) .....	47
3. Quelles sont les fonctions mises en jeu ?.....	48
III. La destruction de la vascularisation par l'irradiation unique à forte dose .....	50
1) La réémergence de l'hypofractionnement.....	50
1. Première dynamique: l'évolution interne à la RT fractionnée .....	50
2. Seconde dynamique : le retour de l'hypofractionnement.....	51
3. Les modèles animaux et l'implication de la vascularisation dans la réponse à l'irradiation forte dose .....	51
Les syndromes entraînés par l'irradiation à forte dose : .....	51
L'explication classique par la mort clonogénique .....	52
Exploration par les souris KO et retour de l'apoptose .....	53
Le cas du syndrome gastro-intestinal : l'implication de l'endothélium microvasculaire .....	54
Le modèle du syndrome gastro-intestinal élaboré par le groupe Potten:.....	54
La réévaluation du modèle par le groupe Kolesnick : .....	55
Une signature spécifique pour l'apoptose vasculaire .....	57
L'extension du modèle à la vascularisation tumorale dans les modèles de tumeurs .....	57
2) Implication de la voie ASM/céramide dans la mort de l'endothélium .....	58
1. Le cycle métabolique de base :.....	58
La voie de novo :.....	59
Les étapes golgiennes :.....	59
Atteindre la membrane plasmique .....	61
La voie de recyclage : .....	62
2. Le basculement vers une voie de transduction :.....	67

## Sommaire

Les cellules leucémiques et la génération de céramide.....	67
La connexion apoptose/céramide :.....	68
La balance S1P/céramide .....	69
L'émergence du concept de rhéostat céramide/sphingosine-1-phosphate.....	69
3. La voie apoptotique du céramide dans l'endothélium .....	74
L'endothélium comme cible critique du couple ASM/céramide : .....	74
Les relais moléculaires du céramide dans l'endothélium : .....	75
Le céramide, agent de remodelage membranaire:.....	86
<b>Résultats</b> .....	99
I. Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire : .....	99
1) Les radiations entraînent l'apoptose des cellules microvasculaires via le couple ASM/céramide et la voie p38 :.....	99
1. Le modèle HMEC-1 vérifie l'engagement du couple ASM/céramide par l'irradiation haute dose.....	99
2. Une voie p38 pro-apoptotique est activable (pharmacologiquement et par l'irradiation) dans les cellules HMEC-1.....	101
3. L'IR forte dose entraîne l'apoptose des cellules microvasculaires par activation de la voie p38 .....	104
4. L'IR forte dose déclenche une voie commune ASM/céramide/p38 (le couple ASM/céramide contrôle l'induction de la voie apoptotique p38) .....	106
2) Le couple ASM/céramide, activé par l'irradiation, agit en modulant l'organisation membranaire des cellules microvasculaires : .....	109
1. L'irradiation provoque l'externalisation de la sphingomyélinase acide et le remodelage membranaire.....	109
2. Le remodelage membranaire radioinduit gouverne l'induction de la voie apoptotique p38	112
3. L'IR active également la voie ASM/céramide/p38 dans les cellules primaires et les tissus	114
3) Les ROS, intermédiaires entre IR et ASM, suggèrent un mécanisme s'élargissant/applicable aux agents chimiothérapeutiques.....	116
1. L'irradiation active le couple ASM/céramide via les ROS.....	116
2. Divers agents chimiothérapeutiques pourraient engager une réponse contrôlée par p38 dans l'endothélium microvasculaire .....	122
3. Conclusion.....	123
II. Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate..	124
III. Autres publications :.....	162
1) La sphingosine-1-phosphate protège les cellules endothéliales de l'apoptose radioinduite :	162
2) Evaluation de la toxicité et de l'efficacité d'un traitement combiné entre radioimmunothérapie et traitement anti-angiogénique .....	172
3) Signalisation émanant de la membrane plasmique suite à l'irradiation ionisante (Revue) ...	192
<b>Discussion</b> .....	209
I. Au-delà du concept de cible primaire .....	209
1) Comprendre le mécanisme de destruction vasculaire :.....	210

## Sommaire

1.	Définition d'une séquence d'évènements partant de la membrane et conduisant à l'apoptose des cellules endothéliales .....	210
2.	Premier enjeu: quelles sont les bases moléculaires déterminant l'engagement d'une « cible critique » ? .....	211
	Les chainons moléculaires manquants .....	211
	La modélisation et les cibles critiques.....	212
3.	Second enjeu : remaniements membranaires, des modèles in vitro aux études in vivo	212
4.	Troisième enjeu : vers des souris KO de « seconde génération » : les KO conditionnels tissus-spécifiques.....	213
2)	Etre capable de moduler cette destruction vasculaire : .....	213
1.	Bilan : un agent pharmacologique, inhibant la vague de mort précoce des cellules endothéliales, s'étendant au tissu par le jeu du couplage vasculaire/clonogénique.....	214
2.	Premier enjeu : sur quelle(s) base(s) s'établit la spécificité d'action de la S1P ?.....	214
3.	Second enjeu: La S1P, un agent de protection de l'endothélium sain.....	216
4.	Troisième enjeu : Une fonction de protection généralisable à tous les facteurs pro-angiogéniques ?.....	216
II.	Quelle jonction avec les traitements anticancéreux ?.....	217
1)	Rappel : principe d'action des thérapies anti-cancéreuses .....	217
2)	Application à l'homme : .....	218
1.	L'engagement de l'endothélium en clinique .....	218
2.	Le statut de l'axe sphingosine kinase/sphingosine-1-phosphate dans les tumeurs..	218
3.	L'hétérogénéité de l'endothélium tumoral.....	219
4.	L'impact des thérapies anti-vasculaires.....	219
3)	Les voies mises en évidence peuvent-elles constituer des cibles thérapeutiques ? .....	221
1.	p38 : .....	221
2.	Akt :.....	222
<b>Matériel et Méthodes:</b>	.....	224
I.	Cultures cellulaires et traitements : .....	224
1)	Cultures cellulaires .....	224
1.	Lignée HMEC-1.....	224
2.	Cellules primaires HMVECs.....	224
3.	Cellules épithéliales .....	224
4.	Cellules mononucléées du sang périphérique.....	224
2)	Traitements : .....	225
3)	Inhibition par RNA interférence .....	226
II.	Approches biochimiques : .....	226
1)	Essai DAG kinase.....	226
2)	Activité sphingomyélinase acide .....	227
3)	Activité DEVDase .....	227
4)	Western Blot.....	227
III.	Imagerie.....	228
1)	Coloration .....	228
1.	Marquage de p38: .....	228
2.	Marquage de la sphingomyélinase acide .....	229
3.	Marquage des radeaux lipidiques .....	229
4.	Détection de la phosphorylation de l'histone H2AX .....	229

## Sommaire

5.	Contre-marquage nucléaire:.....	229
2)	Acquisition.....	229
IV.	Approches fonctionnelles.....	229
1)	Survie/apoptose.....	229
1.	Test de comptage cellulaire.....	229
2.	Détection du marqueur apoptotique Apo2.7 :.....	230
2)	Test de clonogénicité sur cellules épithéliales.....	230
3)	Analyse du cycle cellulaire.....	230
4)	Prolifération.....	230
5)	Marquage multi-paramétrique des cellules mononucléées.....	230
V.	Modèles murins.....	231
1)	Animaux et traitements.....	231
1.	Elevage.....	231
2.	Expérimentations :.....	231
	Irradiations.....	231
	Traitements par des agents génotoxiques :.....	231
	Injection de LPS.....	231
	Traitements préalables à l'irradiation.....	231
	Transplantation de moëlle osseuse.....	232
2)	Immunohistochimie.....	232
1.	Préparation des tissues.....	232
2.	Marquages.....	232
	Marquage hématoxyline.....	232
	Marquage éosine.....	232
	Marquage TUNEL.....	232
	Marquage p38 phosphorylé.....	233
	Marquages CD31 et Akt :.....	233
	Dénombrement des cryptes.....	233
	Comptage des leucocytes.....	233
	Mesure du TNF sérique.....	233
3.	Acquisition.....	234
3)	Survie des souris et évaluation des causes de la mort.....	234
	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>235</b>

# Introduction

---

Les thérapies anti-cancéreuses se sont bâties en moins d'un siècle. Cette émergence rapide s'est donc produite concomitamment à l'exploration des mécanismes mêmes de la tumorigénèse. La conséquence directe de cette simultanéité est que les concepts prévalant en thérapie se superposent étroitement à ceux de l'oncogénèse fondamentale découverts essentiellement dans les années 50. La première partie de cette introduction dressera un rapide état des lieux de ces connaissances, soulignant la place centrale occupée par les oncogènes dans l'étude de la tumorigénèse, et le ciblage correspondant des voies de prolifération par les agents thérapeutiques.

Malgré des amorces sporadiques au début et au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle, ce n'est que depuis les années 70 que le concept de microenvironnement tumoral a pris son essor jusqu'à être reconnu comme un acteur majeur du processus de tumorigénèse. Une telle modification des concepts fondateurs de l'oncogénèse aboutit, avec un décalage, à une réévaluation des stratégies anti-cancéreuses. C'est cette dynamique nouvelle que nous présenterons dans la seconde partie, dans le cadre de la vascularisation tumorale, en nous focalisant dans la dernière partie sur l'impact des rayons ionisants à forte dose sur l'endothélium vasculaire. C'est en redescendant à l'échelle moléculaire que nous conclurons cette introduction, en exposant les circuits gouvernant la mort des cellules endothéliales.

## I. Les thérapies anti-cancéreuses classiques

### 1) La Théorie de la Mutation Somatique, cadre actuel de l'explication des cancers

L'ensemble des pathologies désignées sous le terme générique de cancer se caractérise essentiellement par la présence de cellules hyper-proliférantes, présentant des altérations de leur phénotype différencié.

L'apparition de leucémies radioinduites chez les patients traités par les premiers essais de radiothérapie au début du XX<sup>e</sup> siècle, et les propriétés tumorigènes de certains agents chimiques ont constitué les premiers indices permettant de comprendre comment apparaissent les cancers. En effet, ces deux agents sont des mutagènes puissants, et ces résultats indiquent que des mutations pourraient déclencher l'apparition de cancers.

Or, à partir des années 50, l'essor de la biologie moléculaire va fournir les outils permettant d'explorer cette piste des altérations de l'ADN comme principale cause des tumeurs, en employant l'un des modèles-phares de l'époque : le virus. L'identification de séquences d'ADN codées par les rétrovirus et conduisant à la transformation des cellules-hôtes va aboutir à la mise en place du concept de proto-oncogènes. Si ce concept ne s'avère pas aussi fructueux qu'attendu (ce qui conduit à abandonner la théorie des virus comme cause centrale des tumeurs), l'identification de gènes

# Introduction : les thérapies anticancéreuses

---

endogènes, dont la mutation spontanée peut entraîner l'oncogenèse au même titre que les virus transformants, représente l'acquis majeur de la période.

C'est ainsi qu'est mise en place la Somatic Mutation Theory, théorie actuellement dominante dans l'explication de l'apparition des tumeurs. Ses postulats de base sont qu'une tumeur se développe à partir d'une cellule somatique, dont l'état basal est supposé quiescent et qui accumule des mutations (dominantes) conduisant à une sur-prolifération.

Cette théorie repose essentiellement sur les outils expérimentaux prévalant durant les années 70, c'est-à-dire des tests de transformation cellulaires, robustes, comme celui de formation des foyers, et qui mettent en évidence des perturbations majeures de fonctions cellulaires induites par les oncogènes comme la prolifération (**Rak et Yu, 2004**).

## 1. Les altérations du cycle : les oncogènes- la voie des facteurs de croissance

Les nombreuses mutations caractéristiques du processus de tumorigénèse semblent cependant affecter un nombre restreint de fonctions-clés :

L'identification des oncogènes a abouti au concept que la majorité d'entre eux représentent des régulateurs des voies de prolifération, elles-mêmes sous contrôle des facteurs de croissance. Ces molécules solubles se fixent à des récepteurs couplés à des voies de transduction du signal, aboutissant finalement à l'activation de la machinerie du cycle cellulaire.

La découverte d'une voie alternative d'induction des tumeurs par les virus, basée sur une protéine dont le produit n'est pas un oncogène (l'antigène T du virus SV40, qui bloque Rb, libérant ainsi systématiquement les facteurs E2F) mais un inhibiteur, a conduit à moduler le concept et à introduire la notion des « gènes suppresseurs de tumeurs ».

Sur activer les voies oncogéniques, ou enrayer les freins à la prolifération, aboutit à des phénotypes transformés.

## 2. Les altérations couplées, apoptose et sénescence- les voies de protection

Le concept va connaître des remodelages ultérieurs avec le constat qu'une simple activation des voies oncogéniques ne conduit pas à une surprolifération prolongée des cellules (**Pelengaris et al., 2002**) car des voies de protection sont étroitement connectées aux voies de prolifération : apoptose, sénescence, voies de réponse aux dommages de l'ADN représentent autant d'étapes dont une cellule proliférante doit s'affranchir pour survivre, par la désactivation directe ou via les réseaux de signalisation gouvernés par les oncogènes suractivés (**Lowe et al., 2004, Bartkova et al., 2006** ou **Di Micco et al., 2006**).

Au cours de ce processus, les altérations des voies de protection, et plus généralement l'ensemble des altérations qui vont s'accumuler lors de l'évolution de la tumeur, sont étroitement conditionnées par l'oncogène dérégulé initialement, et en demeurent dans certains cas dépendantes, aboutissant au concept d' « oncogene-addiction » (**Weinstein, 2000**).

Pourtant, cette théorie devra probablement être remodelée pour prendre en compte diverses notions supplémentaires. Ainsi, bon nombre de cancers démarrent dans des cellules épithéliales hautement proliférantes; dans ce cas, les voies de protection associées devraient voir leurs niveaux de permissivité augmentés.

La théorie ne prend pas non plus en compte l'intégration des réseaux oncogéniques dans des systèmes de régulation plus vastes que sont les voies de différenciation. L'altération des voies de différenciation est d'ailleurs le second trait caractéristique des néoplasmes. Un aspect important de



# Introduction : les thérapies anticancéreuses

---

cette question est comment les interactions entre cellules conditionnent le lancement de ces programmes (en d'autres termes, comment des altérations dans les relations entre ces cellules pourraient constituer des événements primaires conduisant à l'altération des programmes de différenciation et enfin à la régulation des oncogènes).

La théorie accorde également une place limitée aux tumeurs émergeant de mécanismes d'instabilité génétique (**Soto et Sonnenschein, 2004**)

## 2) Des défauts formant la base des thérapies anticancéreuses classiques

Ce corps de connaissances n'est pas élaboré au début du XXe siècle, lorsque démarrent les premières tentatives de thérapies anti-cancéreuses, qui se heurtent d'emblée à un problème spécifique: la nature endogène de la pathologie, qui a pour conséquence directe qu'un traitement efficace contre les cellules tumorales risque d'atteindre également les tissus sains.

Au début du XXe siècle, les thérapies anti-cancéreuses sont limitées aux interventions chirurgicales, rendant impossible le traitement des tumeurs diffuses ou des tumeurs solides placées dans des zones difficilement accessibles ; en outre, les nombreuses cellules tumorales résiduelles sont susceptibles de recroître et donc d'annuler les bénéfices de l'intervention.

### 1. La radiothérapie :

A la fin du XIXe siècle, la découverte quasi-simultanée de deux sources différentes de rayons électromagnétiques, les rayons X et  $\gamma$ , s'accompagne aussitôt de tentatives d'application thérapeutique de ces rayons. Quoique le mécanisme par lequel ces deux types de rayon sont générés diffère (les rayons X sont produits par libération de photons lors de la désintégration du noyau instable d'un radionucléide, tandis que les rayons  $\gamma$  sont générés par désexcitation d'une cible frappée par des électrons à haute vitesse), ils sont identiques dans leur nature finale : ce sont des rayonnements ionisants constitués de photons.

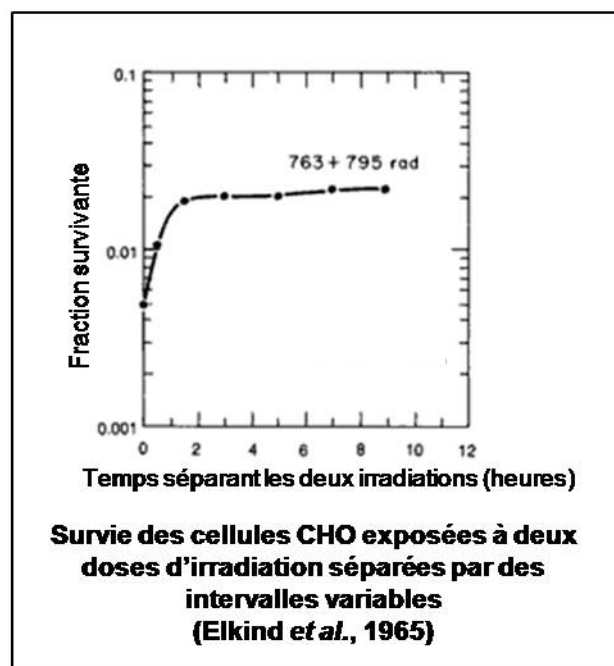
Les premiers essais thérapeutiques sont basés sur le modèle de l'exérèse chirurgicale : un acte, unique et curatif, est pratiqué sur le patient. Pour cela, on recourt à une radiation à forte dose. Les réponses initialement observées sont assez impressionnantes, mais c'est à long terme que l'efficacité des stratégies semble limitée. Non seulement la croissance tumorale peut reprendre, mais surtout, de graves effets secondaires apparaissent dans les années suivant le traitement : cela peut aller de réactions immédiates aux radiations, comme des ulcérations cutanées, à des effets à long terme, comme l'apparition de fibroses pulmonaires... et même de leucémies radioinduites.

Dans les années 20, la radiothérapie expérimentale s'attaque à cet épineux problème : les rayonnements ionisants ont un effet évident sur les cellules tumorales, mais il faut parvenir à en tirer parti en minimisant les atteintes aux tissus sains. A l'époque, le manque de modèles tumoraux chez l'animal conduit les scientifiques de « l'école française » à tenter d'isoler des schémas applicables aux patients en recourant à une approche d'irradiation des tissus sains. Cherchant à simuler la différence de prolifération entre les cellules tumorales et les tissus sains, les scientifiques choisissent d'irradier des gonades de rats, un organe alliant un stroma classique, donc relativement quiescent, avec un compartiment de cellules germinales hautement proliférantes, représentant respectivement un tissu sain et un équivalent de tissu tumoral. L'objectif est de trouver un protocole conduisant à la stérilisation des animaux, indiquant la destruction du compartiment germinale, sans provoquer pour autant une ulcération des organes, qui reflète les altérations du stroma. Ceci est atteint en appliquant des irradiations à faibles doses, réparties sur plusieurs semaines. Ces travaux expérimentaux vont rapidement être transférés en essais cliniques, donnant naissance à la

## Introduction : les thérapies anticancéreuses

radiothérapie fractionnée, le protocole actuel de référence en matière de radiothérapie : plus de 50% des patients souffrant de cancers reçoivent un tel traitement, qui prend la forme d'irradiations quotidiennes d'environ 2 Gy, pour une dose totale d'environ 60 à 80 Gy, sauf pour des tumeurs particulièrement radiosensibles comme celles affectant les cellules germinales, où l'on emploie des doses totales inférieures, tout comme dans les traitements des enfants (**Bernier *et al.*, 2004**).

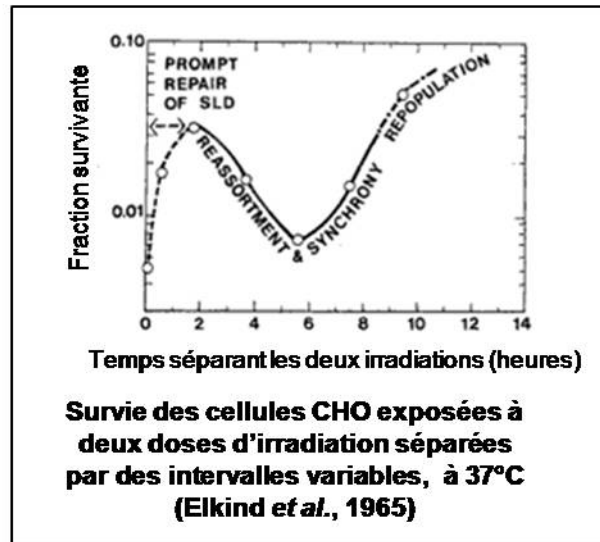
A compter des années 60, le développement de techniques de biologie cellulaire va permettre de délimiter les mécanismes biologiques expliquant l'efficacité de la radiothérapie fractionnée, qui demeure jusqu'alors essentiellement empirique, d'un point de vue clinique comme expérimental. Les expériences décisives d'Elkind montrent que si on fractionne une dose donnée en deux irradiations, on accroît la survie de la population cellulaire ciblée, et ce, de façon croissante avec l'intervalle laissé entre les deux irradiations. Ceci est vrai jusqu'à un temps donné, 2h dans l'expérience originale, au-delà duquel aucun gain en survie n'est obtenu.



L'interprétation de ce résultat est qu'un mécanisme doit permettre d'atténuer l'impact des radiations, que ce mécanisme est rapide puisque visible en quelques minutes, mais qu'il atteint son maximum au bout de 2h. On peut donc distinguer, au sein de la première irradiation, une part incompressible de dommages délétères, et une portion de « dommages sub-létaux », qui seront diminués par ce mécanisme de réparation.

Les expériences vont plus loin, puisque lorsqu'on les réalise à une température normale, c'est-à-dire en permettant aux cellules de progresser normalement dans le cycle cellulaire, la courbe simple obtenue dans la première expérience se complexifie quelque peu :

# Introduction : les thérapies anticancéreuses



Passé un intervalle suffisant, on retrouve un accroissement de la mort, proportionnel au temps écoulé. Les cellules survivantes, concentrées lors de la première irradiation dans des phases du cycle leur offrant une plus grande résistance, se redistribuent en effet dans toutes les phases, et deviennent, de ce fait, pour partie vulnérables à l'irradiation. Enfin, quand l'intervalle de temps devient vraiment important, les cellules en état de se diviser se multiplient et accroissent la fraction survivante.

Réparation, redistribution, repopulation constituent les « 3 R », principes fondamentaux de la radiobiologie, complétés par la nécessité de la présence d'oxygène pour que les rayonnements ionisants produisent de façon efficace des espèces radicalaires. Ils permettent de fait de comprendre l'efficacité des protocoles de radiothérapie fractionnée à l'échelle cellulaire : en laissant un intervalle de temps suffisant entre deux irradiations, on laisse le temps aux cellules des tissus sains de réparer les dommages sub-létaux, tandis que les cellules tumorales ultra-proliférantes subissent l'accumulation de dommages et une mort mitotique massive. L'intervalle doit donc cependant être suffisamment court pour empêcher une réparation ou une surprolifération des cellules tumorales, mais suffisant pour que les cellules saines se débarrassent des dommages sub-létaux et que les cellules tumorales se redistribuent au sein des différentes phases du cycle (Elkind *et al.*, 1965, Hall, 1993)

Les traitements par radiothérapie fractionnée reposent donc essentiellement sur des dommages infligés à l'ADN des cellules tumorales. L'optimisation des doses délivrées et des intervalles séparant chaque irradiation permet de maximiser le ratio des dégâts tumeur/tissus sains.

## 2. La chimiothérapie :

### **Les agents chimiothérapeutiques classiques :**

Les développements de la radiothérapie ont placé au centre des stratégies anti-cancéreuses la recherche d'un effet différentiel maximisé entre tissu tumoral et tissu sain, mais ne permettaient pas un effet systémique, important lorsque le cancer est disséminé à travers plusieurs organes ou circulant.

Forts de ce principe, les chercheurs découvrent dans les années 50 une série de molécules susceptibles de posséder de telles propriétés de « toxicité mesurée » avec un effet systémique. En 1942, des pharmacologistes de Yale tirent parti des symptômes d'aplasie des patients touchés par les

## Introduction : les thérapies anticancéreuses

---

gaz moutarde pour tester un constituant de ce gaz, la méchloréthamine, chez les patients atteints de lymphomes. La régression tumorale observée fonde le développement des molécules de la classe des **agents alkylants**, comportant notamment le cyclophosphamide (s'y adjoindra ultérieurement le cisplatine).

Une approche menée en parallèle aboutit à la synthèse des **antagonistes de la voie de l'acide folique**, au premier rang desquels le méthotrexate. Ce sont les premières molécules à induire une rémission chez les enfants atteints de leucémies aiguës lymphoblastiques, avant que leur action soit appliquée à de nombreuses autres tumeurs.

Ces résultats initiaux seront étendus dans les deux décennies suivantes, avec la découverte des **analogues de purine**, comme la 6-mercaptopurine, des **inhibiteurs du remaniement des microtubules**, comme les alcaloïdes Vinca, et plus tard le paclitaxel/taxol, et enfin des **agents intercalants de l'ADN** (doxorubicine, puis ultérieurement la camptothécine/irinotécan au mode d'action globalement analogue).

La compréhension des mécanismes d'action des agents chimiothérapeutiques classiques, qui se fera parfois *a posteriori*, dégage un principe commun : ces molécules capables de présenter un effet différentiel entre cellules saines et tumorales affectent des fonctions indispensables à la prolifération cellulaire. Ainsi, les **antagonistes de la voie de l'acide folique** coupent les voies de synthèse des bases azotées, tandis que les **agents intercalants de l'ADN** (ou les inhibiteurs directs des topoisomérases) empêchent le déroulement de la double hélice par ces enzymes, donc la progression de la fourche de réplication, tout comme les **agents alkylants** qui créent des pontages intra et inter-brins. Intervenant toujours au sein de la phase S, les **analogues de purine** ne permettent pas l'ajout supplémentaire de nucléotides une fois qu'eux-mêmes sont incorporés dans le brin d'ADN néoformé. Enfin, les **inhibiteurs du remaniement des microtubules** interviennent plus tardivement, durant la mitose, et empêchent le positionnement correct des chromosomes sur le fuseau mitotique et leur ségrégation subséquente.

De façon simplifiée, l'impact de ces drogues peut être résumé ainsi :

- Soit l'action des molécules est drastique, et empêche physiquement la mitose des cellules.
- Soit l'action des molécules conduit, directement ou non, à des dommages de l'ADN (cassures simples ou doubles brins, adduits) et dans ce cas la voie de réponse aux dommages de l'ADN va être déclenchée, bloquant le cycle, voire induisant la mort cellulaire. Si la cellule parvient à maintenir son cycle, une mitose aberrante et fatale découle des dégâts non réparés.

La mort clonogénique occupe donc une place importante dans l'effet des chimiothérapies, comme dans les traitements par radiothérapie.

L'essor des chimiothérapies durant les années 60 va permettre de dégager des principes cruciaux, et des stratégies dont l'influence est encore importante à l'heure actuelle.

Ces molécules bloquent des fonctions cellulaires clés, avec en général des effets de mort cellulaire massive, et possèdent donc une toxicité élevée, lorsque les cellules affectées ne se limitent pas aux cellules tumorales. La gestion de cette toxicité conditionne à la fois les étapes du développement, et les tests en clinique des molécules chimiothérapeutiques :

Le développement d'une molécule chimiothérapeutique consiste généralement dans une première étape à vérifier sa capacité à détruire une ou plusieurs lignées tumorales humaines en culture, puis à valider son effet sur des tumeurs xénogreffées, c'est à dire des lignées injectées en général en sous-cutané chez la souris. On étudie alors la croissance du volume tumoral (« % T/C », traité versus

## Introduction : les thérapies anticancéreuses

---

tumoral seul). A cette occasion, les premiers effets drastiques en termes de toxicité sont également détectés, notamment par la perte de poids de l'animal. On dispose alors d'une idée approximative de la dose nécessaire pour obtenir une activité anti-tumorale, et des essais cliniques peuvent être lancés. La notion de toxicité va à nouveau jouer un rôle prépondérant, puisque la phase I des essais cliniques en oncologie consiste justement en une escalade de dose, visant à déterminer la dose maximale tolérée pour la molécule. On cherche toujours à réaliser le difficile équilibre entre maximum d'efficacité thérapeutique et toxicité minimale. Ensuite, les phases II et III permettent d'étudier l'efficacité thérapeutique réelle de la molécule, sur des populations croissantes de patients. Les régimes d'administration eux-mêmes sont conditionnés par l'équilibre efficacité/toxicité, avec des prises sous forme de bolus, puis des intervalles d'une à plusieurs semaines sans traitement pour laisser le temps aux organes possédant des populations cellulaires à forte prolifération, comme l'intestin ou la moelle osseuse, de récupérer des dommages causés par les drogues.

L'autre caractéristique fondamentale qui se dégage dès les premiers essais utilisant les chimiothérapies est l'apparition fréquente d'une résistance des tumeurs aux thérapies. Les effets des chimiothérapies sont fréquemment transitoires, les gains thérapeutiques étant occultés par une croissance ultérieure, permise par l'acquisition d'une résistance spécifique à la molécule. Face à ce constat, l'idée prévaut jusque dans les années 70 qu'une optimisation des associations entre molécules chimiothérapeutiques (et avec d'autres thérapies, le principe de la chimiothérapie en adjonction à la chirurgie étant acquis dès 1976) doit permettre, en infligeant des dommages rapides et multiples, d'atteindre des rémissions même sur les tumeurs les plus résistantes (**Chabner et Roberts, 2005**).

### *Les thérapies ciblées : le bouleversement des années 80*

#### **Un double succès emblématique pour les thérapies ciblées**

Alors que les fondements des deux grandes stratégies anti-cancéreuses, radio et chimiothérapie, sont jetés au début des années 80, c'est la percée dans la compréhension du fonctionnement des oncogènes, évoquée précédemment, qui va aboutir à une nouvelle approche en chimiothérapie. La possibilité s'ouvre en effet de cibler une protéine dont dépendent plusieurs voies activées spécifiquement dans les cellules tumorales, et qui conduisent ensuite notamment à la surprolifération. Non seulement l'approche constitue un déplacement du ciblage thérapeutique vers l'amont des mécanismes oncogéniques, mais le rapide décryptage des voies de signalisation associées aux différents oncogènes permet d'identifier un grand nombre de cibles (facteurs de croissance, récepteurs à ces facteurs, et voies de transduction associées, protéines du cycle cellulaire et modulateurs de l'apoptose) et d'espérer, par des techniques de criblage à haut débit, pouvoir développer de nombreuses molécules spécifiques, par opposition au développement relativement empirique des agents chimiothérapeutiques classiques. Les critères recherchés pour ces nouveaux agents anticancéreux sont plus drastiques : d'abord, on attend d'eux que leur ciblage de voies oncogéniques s'accompagne d'une baisse des effets de toxicité sur les tissus sains. Ensuite, on cherche à obtenir des molécules métaboliquement stables, et si possible administrables oralement (**Sawyers, 2004**).

L'archétype du développement réussi de ces thérapies ciblées sera l'imatinib mésylate, ou Glivec. Il est issu d'un criblage parmi les inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase et a été choisi car il inhibe une protéine de fusion, BCR-Abl, issue d'une translocation chromosomique fréquemment retrouvée dans les leucémies myéloïdes chroniques. En inhibant l'activité kinase d'Abl, la molécule empêche l'activité anti-apoptotique de la protéine aberrante BCR-Abl. Elle est approuvée en 2001

## Introduction : les thérapies anticancéreuses

---

pour les leucémies myéloïdes chroniques, constituant ainsi le premier inhibiteur spécifique de protéine kinase validé pour l'usage clinique (**Capdeville et al., 2002**).

Les inhibiteurs du récepteur à l'EGF (EGFR) représentent l'autre thérapie ciblée dont l'utilisation a été validée en clinique, même si leurs résultats sont plus mesurés. Ils bloquent soit la partie externe du récepteur (cetuximab, approuvé en 2004 par la FDA), soit directement son domaine kinase (gefitinib/iressa, approuvé en 2003 par la FDA, en association avec la chimiothérapie, dans le cancer du colon) (**Burton, 2002** et **Sawyers, 2003**). Ils sont essentiellement approuvés comme agents de seconde ligne.

Ces succès des thérapies ciblées reposaient probablement en partie sur le ciblage spécifique des lésions oncogéniques elles-mêmes. Un des enjeux dans le développement de nouveaux agents est désormais de savoir si l'on peut étendre ce concept à des défauts dans la signalisation intracellulaire en dehors de l'oncogène lui-même, en particulier dans les voies de l'apoptose (**Del Gaizo Moore et Letai, 2008**), du cycle cellulaire (**Sawyers, 2004**), ou de la réponse aux dommages de l'ADN (**Edwards et al., 2008**, **Sakai et al., 2008** et **Martin, 2008**).

### Difficultés des développements thérapeutiques en oncologie :

Malgré ces deux vagues de découvertes successives, le développement des traitements en oncologie demeure aujourd'hui l'un des plus difficiles, avec des taux d'échecs supérieurs à la moyenne dans toutes les phases des essais cliniques : les molécules anti-cancéreuses sont plus rejetées que les autres du fait de leur toxicité (phase 1 ; 40% d'échec contre 35% en moyenne), et plus fréquemment abandonnées ensuite du fait de leur manque d'efficacité (70% d'échec en phase 2 contre 60% en moyenne, 59% en phase 3 contre 45% en moyenne). Parmi les échecs marquants, celui de l'application en clinique des inhibiteurs de farnésyl transférase, inhibant la voie Ras.

Les principales causes envisagées à ces échecs reposent d'abord sur la difficulté de disposer de modèles précliniques satisfaisants. Ceci concerne d'abord l'évaluation de l'efficacité des molécules. En premier lieu, la preuve systématique du mécanisme moléculaire précis pourrait constituer un préalable à toute étude. Ensuite, les tumeurs se caractérisent par leur grande hétérogénéité, une caractéristique mal simulée par les lignées tumorales qui servent aux premiers essais d'efficacité des molécules. De même, le système de validation in vivo, les tumeurs xénogreffées, est très largement perfectible. Le microenvironnement murin est différent de celui de l'homme, notamment au niveau immunitaire, mais surtout la localisation artificielle (en général en sous-cutané) de même que la rapidité de la croissance des tumeurs ne simule pas de façon satisfaisante les interactions de la tumeur avec le stroma de l'hôte.

Il doit également être possible d'améliorer les données relatives à la toxicité « sur cible » des molécules avant le démarrage des essais cliniques, à condition de bien délimiter leurs cibles moléculaires, par l'emploi d'inactivations génétiques ciblées chez l'animal (invalidation tissu-spécifique ou si RNA) (**Kamb et Lengauer, 2007**).

Un problème récurrent des chimiothérapies est constitué par l'apparition de résistance au sein des cellules tumorales traitées. Dès les premiers essais thérapeutiques utilisant les agents alkylants, on a observé que les rémissions (en l'occurrence des lymphomes) n'étaient que temporaires. Mais les thérapies ciblées n'échappent pas à ce phénomène : lorsque l'imatinib est donné en traitement des leucémies aiguës, un échappement massif se produit, reposant sur des mutations du domaine kinase d'Abl dans les cellules tumorales. De même, des mutations se développent dans le récepteur à l'EGF lorsque les cellules sont soumises au gefitinib (**Pao et al., 2005**). L'échappement peut même se produire par couplage du récepteur à d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase, ce qui permet le maintien de son activité (**Engelman et al., 2007**). La rapidité de l'apparition de ces résistances

## Introduction : les thérapies anticancéreuses

---

pourrait conduire aujourd'hui à la recherche de thérapies ciblées mais à large spectre, c'est-à-dire capables d'inhiber plusieurs récepteurs à la fois, rendant plus difficile l'apparition de mutants résistants avant que les voies de mort aient détruit les cellules tumorales. C'est notamment le cas des inhibiteurs sorafénib et sunitinib, des inhibiteurs de tyrosine-kinase multi-cibles, c'est-à-dire moyennement spécifiques, ce qui leur permet d'inhiber les domaines kinases des trois récepteurs au VEGF, le récepteur au PDGF, et respectivement Raf et RET (**Arbiser, 2007**).

Face à ces difficultés, et outre une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires et une amélioration des modèles précliniques, le recours à des marqueurs moléculaires (pour appuyer la classique caractérisation histologique des tumeurs) afin de détecter à la fois l'apparition de résistances mais aussi les preuves de l'atteinte de la cible par la drogue est fréquemment évoqué comme un outil majeur d'amélioration des thérapies centrées sur la prolifération des cellules tumorales, y compris des combinaisons qui constituent à l'heure actuelle la majorité des essais cliniques (**Sawyers, 2008**). De tels marqueurs pourraient également améliorer de façon notable l'efficacité des thérapies ciblées en identifiant les patients dont les tumeurs portent un récepteur muté ou un défaut spécifique des voies apoptotiques ou de réparation de l'ADN.

## **II. L'interaction avec le microenvironnement : le rôle clé de la vascularisation tumorale**

Les recherches menées sur le cancer, tant du point de vue fondamental que des thérapies, se sont focalisées sur les mécanismes autonomes à la cellule cancéreuse, une « vision réductionniste » du cancer, qui se base sur les mutations affectant des gènes spécifiques pour expliquer le développement ultime de la pathologie. En parallèle, les recherches menées pour comprendre quels facteurs influençaient la dissémination des métastases dans un tissu donné ont, dès le début du XXe siècle, souligné combien le microenvironnement pouvait être crucial (Paget, Lancet, 1889). Ce n'est que durant les années 70 que le concept prend sa pleine dimension, lorsque Mintz et Ilmensee montrent que des tétracarcinomes murins réinjectés dans des blastocystes ne donnent pas naissance à des tumeurs (**Mintz et Ilmensee, 1975**). En d'autres termes, c'est alors qu'on commence à envisager que le microenvironnement puisse intervenir dans le développement même de la tumeur primaire.

Vingt ans plus tard, en dressant la liste des fonctions-clés systématiquement altérées dans les processus de tumorigénèse, Weinberg et Hanahan citent 4 fonctions internes que nous avons évoqué précédemment (autosuffisance en signaux de croissance, insensibilité aux signaux inhibant celle-ci, échappement à l'apoptose et potentiel illimité de réplication), et deux supplémentaires, l'invasion tissulaire (et la métastase), et l'angiogenèse, montrent le rôle décisif que joue l'interaction avec le microenvironnement durant la croissance tumorale (**Hanahan et Weinberg, 2000**). C'est à l'acquisition par une tumeur d'une vascularisation, et aux approches thérapeutiques cherchant à la détruire, que sera consacrée cette partie.

### **1) Le concept initial de l'angiogenèse comme facteur limitant de la croissance tumorale (Folkman)**

Au début des années 1970, diverses données suggèrent la présence d'une vascularisation propre aux tumeurs solides. Elle avait été observée dès la fin du XIXe siècle chez les patients, dont les tumeurs excisées présentent souvent des épanchements hémorragiques, avant d'être confirmée expérimentalement durant les années 30 dans les tumeurs transplantées chez l'animal.



## Introduction : la vascularisation tumorale

---



Mais pour autant, la vascularisation tumorale n'est pas envisagée à l'époque comme un facteur déterminant de la croissance tumorale, comme le résume cette note du National Cancer Institute en 1970:

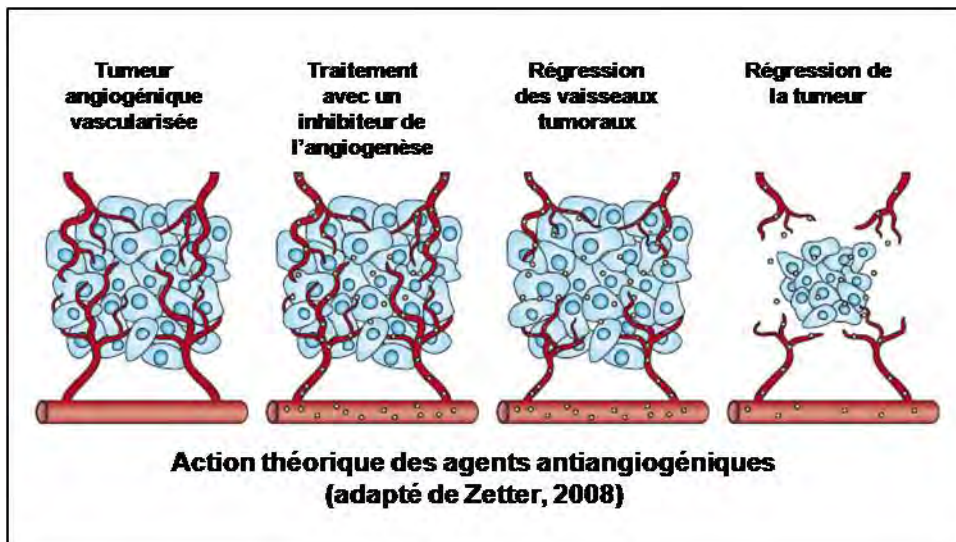
« Il est de notoriété publique que l'hypervascularisation associée aux tumeurs résulte de la dilatation des vaisseaux-hôtes, et non de la présence de vaisseaux nouvellement formés. Cette dilatation est probablement un effet secondaire des cellules tumorales mourantes. Par conséquent, la croissance tumorale ne peut pas être dépendante de la croissance des vaisseaux sanguins, pas plus qu'une infection n'est dépendante du pus. »

( [http://www.childrenshospital.org/cfapps/research/data\\_admin/Site2580/mainpageS2580P1.html](http://www.childrenshospital.org/cfapps/research/data_admin/Site2580/mainpageS2580P1.html) )

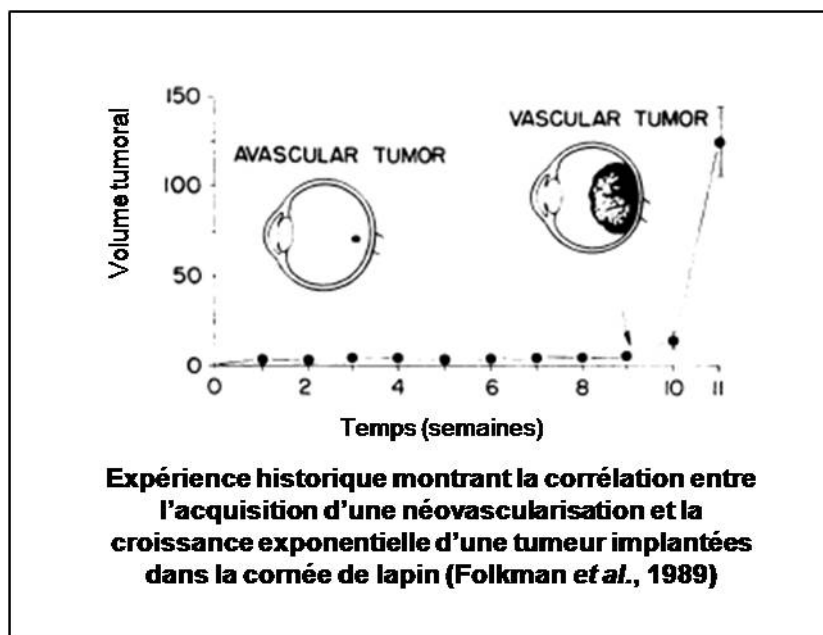
Le rôle de la vascularisation tumorale va basculer au cours des années 1970. Utilisant un modèle ex vivo de transplantation de mélanomes dans des thyroïdes isolées, Judah Folkman démontre que ces tumeurs ne dépassent pas un diamètre de 1 à 2 mm, stade où leur croissance semble bloquée, alors qu'elle se poursuit si les tumeurs sont implantées chez l'animal. En outre, les tumeurs ex-vivo sont avasculaires, tandis que celles qui sont réimplantées développent une forte vascularisation (**Folkman, 1971**).

En partant de ces données empiriques et corrélatives, Folkman va publier en 1971 une théorie de l'angiogenèse tumorale : il y propose que les tumeurs solides soient extrêmement dépendantes de la croissance de nouveaux vaisseaux, qu'elles doivent stimuler par la libération de facteurs solubles. Ces facteurs solubles pourraient représenter une cible majeure des thérapies anti-cancéreuses, à même de maintenir les tumeurs dans un état de développement peu avancé.

## Introduction : la vascularisation tumorale



Folkman développe alors des outils originaux pour appuyer son concept. Ainsi, en implantant des carcinomes dans le vitrée de l'œil de lapin, zone non vascularisée, il pût montrer le blocage de la croissance tumorale jusqu'à ce que les tumeurs atteignent la cornée, dont elles cooptent le réseau vasculaire, croissant alors à un rythme exponentiel (Brem *et al.*, 1976).



En dehors de ces données expérimentales, l'ensemble des mécanismes gouvernant l'angiogenèse tumorale restait à établir. On ne connaissait aucun des éventuels facteurs angiogéniques, mais surtout on ne disposait pas du référentiel qu'aurait pu constituer la connaissance des mécanismes gouvernant la mise en place physiologique de la vascularisation au cours du développement. Les recherches dans les deux champs, physiologique et tumoral, ont donc évolué conjointement après la formulation du postulat de Folkman.

### 2) De l'angiogenèse embryonnaire à la vascularisation tumorale :

# Introduction : la vascularisation tumorale

---

## 1. Les bases mécanistiques de l'angiogenèse physiologique

Comprendre les mécanismes gouvernant la mise en place de la vascularisation au cours du développement constituait un défi difficile au début des années 1980:

- aucun des facteurs angiogéniques prédits par Folkman n'a alors été identifié, et les méthodes pour y parvenir sont longues et complexes (identification d'une activité pro-angiogénique dans un tissu ou un surnageant, purification par chromatographie, isolement de la protéine et identification du gène codant). Elles aboutissent progressivement à l'identification des principaux facteurs angiogéniques : le FGF (1985), mais surtout le VEGF (1989), et l'angiopoiétine (1996) (**Ferrara, 2002**).

- Si les grandes étapes de la mise en place de la vascularisation ont été décrites par les embryologistes, on ne dispose alors pas d'outil pour manipuler ces systèmes in vivo. En parallèle de l'isolement des facteurs angiogéniques, l'avènement des modèles de souris transgéniques et le perfectionnement des techniques de visualisation de la vascularisation vont, en 15 ans, permettre de poser les principaux fondements mécanistiques de la vascularisation physiologique (**Folkman, 2007**).

### **La vasculogenèse :**

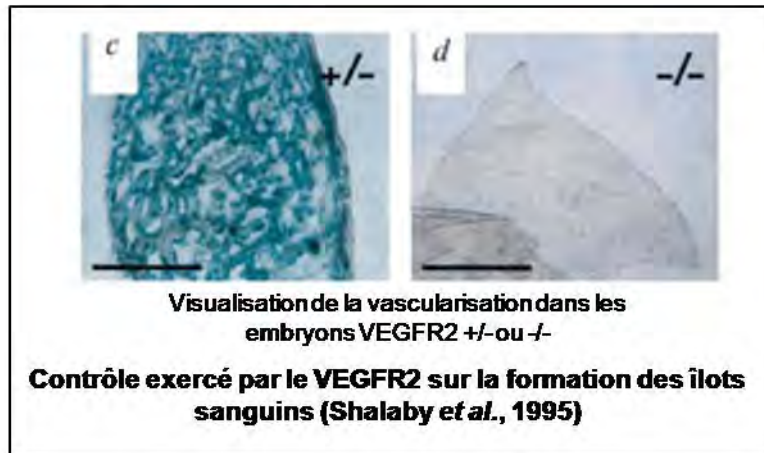
L'étape initiale est désignée sous le nom de **vasculogenèse**: les précurseurs des cellules endothéliales se disséminent puis servent de base à l'édification d'un réseau vasculaire primitif. Le VEGF joue un rôle décisif dans la régulation de cette étape.

### **La formation et la migration des précurseurs**

Initialement, des cellules issues du mésoderme vont, sous l'effet de facteurs tels que le FGF et MBP-1, se pré-différencier en hémangioblastes, précurseurs des cellules hématopoïétiques et endothéliales, exprimant le récepteur au VEGF Flk1/VEGFR2 (Mikkola, 2002). Ces cellules « pionnières » se disséminent à la périphérie de l'embryon, dans le sac vitellin, formant des « îlots sanguins », et en divers points à l'intérieur de l'embryon. Ce processus débute très peu de temps après la gastrulation (soit au 7<sup>e</sup> jour après la fécondation de l'œuf, chez la souris). Les îlots sanguins du sac vitellin sont formés de précurseurs endothéliaux (qui occupent la périphérie de chaque îlot) et de précurseurs des érythrocytes (au cœur de chaque îlot). Dans l'embryon, par contre, on ne trouve dans les amas que des angioblastes, les cellules-précurseurs des cellules endothéliales (**Coultas et al., 2005**).

L'invalidation génétique du récepteur VEGFR2, ou Flk -1 empêche la formation de tout précurseur hémangioblastique, en particulier des îlots sanguins extra-embryonnaires, et résulte en une létalité embryonnaire précoce (E9) (**Shalaby et al., 1995**).

## Introduction : la vascularisation tumorale



### La formation du réseau vasculaire primitif :

Les précurseurs endothéliaux vont alors former des structures vasculaires primitives selon deux modalités :

- les angioblastes peuvent, sous l'effet du VEGF produit localement, se diviser et former un plexus, un large réseau de cellules connectées. Ces réseaux vont connaître un lent remodelage par fusions pour aboutir à des capillaires primitifs.

De tels plexi se forment dans le sac vitellin, où ils donneront artères et veines du sac vitellin, dans la partie dorsale de l'embryon, au contact du tube neural, où ils forment le plexus vasculaire péridural, et dans les ébauches de divers organes (poumons, rate, pancréas) (Risau, 1995).

- les angioblastes peuvent également s'agréger directement en vaisseaux primitifs, aboutissant à la formation de l'aorte dorsale et de la veine cardinale de l'embryon.

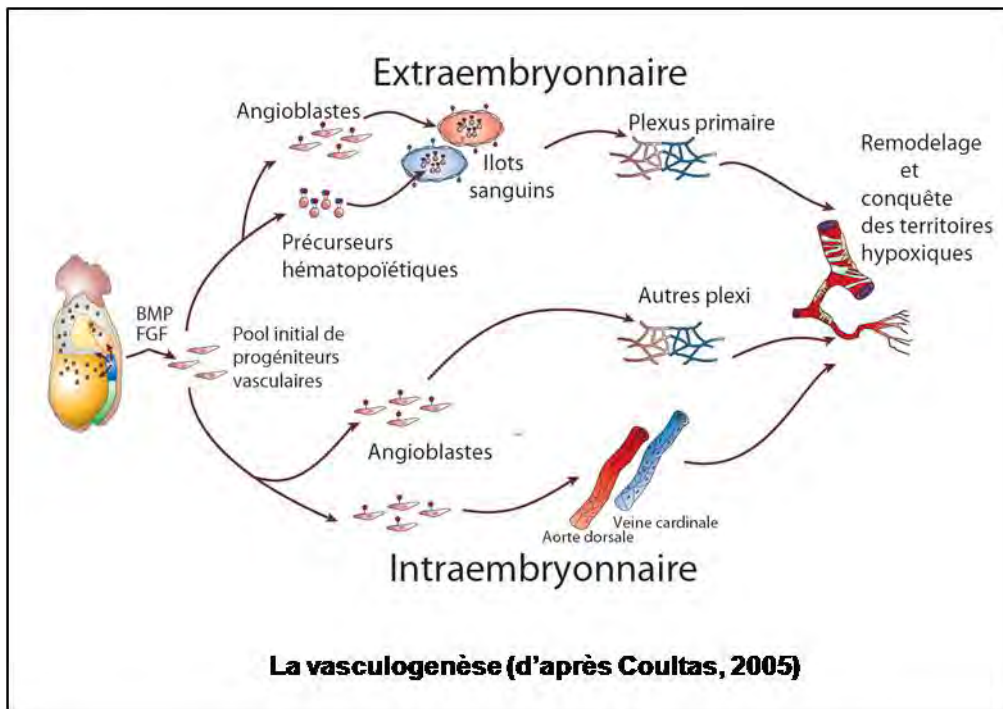
Toutefois, de larges territoires embryonnaires dépourvus des réseaux primitifs persistent dans un état avasculaire.

### Un contrôle global du VEGF :

Le facteur clé de ce processus initial de division est donc le VEGF, qui est nécessaire à la spécification, mais aussi la prolifération et la migration des futurs angioblastes.

Outre le VEGFR2, un autre récepteur du VEGF, le VEGFR1, ou Flt-1, intervient dans la vasculogénèse. Son inactivation n'empêche pas la formation des îlots sanguins, mais va entraîner une transition mésenchyme/angioblaste massive. Ce surcroît de progéniteurs endothéliaux va entraîner une profonde désorganisation des vaisseaux naissants (létalité : E8-9) (Fong *et al.*, 1995 et 1999). Ce dysfonctionnement pourrait s'expliquer par la haute affinité de ce récepteur pour le VEGF, alors que son activité tyrosine-kinase est plutôt modeste. Il atténuerait donc la quantité de VEGF physiologiquement disponible pour le VEGFR2. Sa suppression conduirait alors à une très grande quantité de VEGF disponible, d'où une surprolifération de cellules endothéliales, qui par elles-mêmes sont totalement fonctionnelles.

# Introduction : la vascularisation tumorale



## **L'angiogenèse :**

Le réseau vasculaire va ensuite être remodelé par un processus complexe connu sous le nom d'angiogenèse (stricto sensu). Il désigne le processus de ramification du réseau vasculaire, ou « sprouting », qui modifie à la fois l'architecture des plexus initiaux, tout en permettant la conquête des territoires avasculaires.

Ainsi, le plexus vasculaire périneural est à l'origine de ramifications vasculaires qui colonisent le rhombencéphale (Risau, 1995) tandis que l'aorte dorsale se ramifie en des artères intersomitiques qui fusionnent ensuite en une artère vertébrale (Coultas *et al.*, 2005).

## **Un modèle général d'hypoxie/perfusion :**

Le modèle prévalant pour expliquer l'angiogenèse repose sur la présence de cellules hypoxiques dans les tissus où la perfusion est limitée ou absente, qui produiraient des signaux capables de déclencher la croissance vasculaire. La diffusion de l'oxygène est classiquement décrite comme étant limitée à une distance de 140  $\mu\text{m}$ .

## **Le système HIF :**

La démonstration formelle de ce mécanisme n'est intervenue qu'après la découverte par Gregg Semenza d'un système moléculaire médiant la réponse des cellules à l'hypoxie, à partir de 1992. Ce système repose sur la synthèse rapide de la protéine HIF- $\alpha$ . En l'absence d'oxygène, trois prolyl-hydroxylases ajoutent un groupement hydroxyle au sein du domaine ODD (Oxygen-Dependant Degradation Domain) de HIF- $\alpha$ , qui est alors reconnue par pVHL (von Hippel-Lindau Syndrom protein), constituant d'un complexe ubiquitine-ligase qui dégrade rapidement HIF- $\alpha$ . En normoxie, la voie est donc constitutivement réprimée au sein des cellules.

# Introduction : la vascularisation tumorale

---

Ce n'est qu'en absence d'oxygène (3-5 % O<sub>2</sub>) que le domaine ODD de HIF- $\alpha$  n'est plus modifié, et la protéine échappe donc à la dégradation, car elle n'est plus reconnue par pVHL. Elle se transloque au noyau où elle s'associe avec HIF- $\beta$  (appelé aussi ARNT) et induit la transcription d'un grand nombre de gènes liés à l'hypoxie, notamment le VEGF (**Semenza et Wang, 1992** et **Semenza, 2003**).

L'invalidation génétique de HIF- $\beta$  n'entrave pas la formation des îlots sanguins, mais leur remodelage dans le sac vitellin, et le développement des capillaires dans les tissus solides de l'embryon, ce qui limite la croissance des organes (**Maltepe et al., 1997**). L'invalidation de HIF- $\alpha$  entrave également la mise en place de la vascularisation.

La détection des niveaux d'oxygène locaux déterminerait donc la croissance et la différenciation vasculaires, tant dans les zones comportant déjà un réseau capillaire primitif, que celles qui en sont dépourvues.

## Le contrôle du VEGF :

Il est à noter que ce phénotype, qu'on ne peut observer dans les souris VEGF -/- dont le développement est entravé dès la vasculogénèse, est retrouvé dans les souris VEGF +/- . En outre, on constate que les niveaux de VEGF synthétisés sont sévèrement altérés dans les souris HIF- $\beta$ . Ceci confirme que non seulement le VEGF joue un rôle-clé dans le contrôle de l'angiogénèse, mais qu'en plus, un contrôle strict des quantités de VEGF présentes dans les tissus est à nouveau nécessaire, l'hétérozygotie n'étant pas suffisante pour assurer une vascularisation normale (**Maltepe et al., 1997, Simon et Keith, 2008**).

Le VEGF pourrait jouer à ce stade le rôle d'un véritable facteur de survie : les zones hypoxiques sont progressivement conquises, et ceci désactive progressivement la boucle HIF/VEGF... en cas d'hyperoxie, conduisant à une inhibition complète du VEGF, les branches du plexus vasculaire qui ne reçoivent plus de VEGF régressent, remodelant ainsi le réseau selon une densité moyenne (**Alon et al., 1995**).

## Le modèle de la vascularisation rétinienne :

Jusqu'en 2002, aucun mécanisme précis n'était venu s'adjoindre à la notion générale que l'angiogénèse était gouvernée par des systèmes de réponse (essentiellement via le VEGF) aux niveaux locaux d'oxygène, tandis que des modèles assez détaillés expliquaient la formation de structures cellulaires ramifiées dans les cellules épithéliales de différents systèmes (trachéal de la drosophile, rénal et pulmonaire des mammifères), avec à chaque fois un système de contrôle récurrent dans ses modalités:

- émission de signaux inducteurs par des cellules restreintes
- ségrégation spatiale de ces signaux, déterminée par une interaction avec des molécules structurales, comme l'héparine

Les travaux menés par Christer Betsholtz ont tiré parti de l'angiogénèse intervenant lors du développement rétinien, structure avasculaire totalement envahie par une néo-vascularisation angiogénique, prenant place en intégralité après la naissance (et donc idéale pour l'observation), et contrôlée par un réseau de cellules bien définies, les astrocytes, pour élucider les mécanismes gouvernant cette ramification. Ils démontrent que les différentes isoformes du VEGF-A coopèrent pour contrôler l'extension du réseau vasculaire :

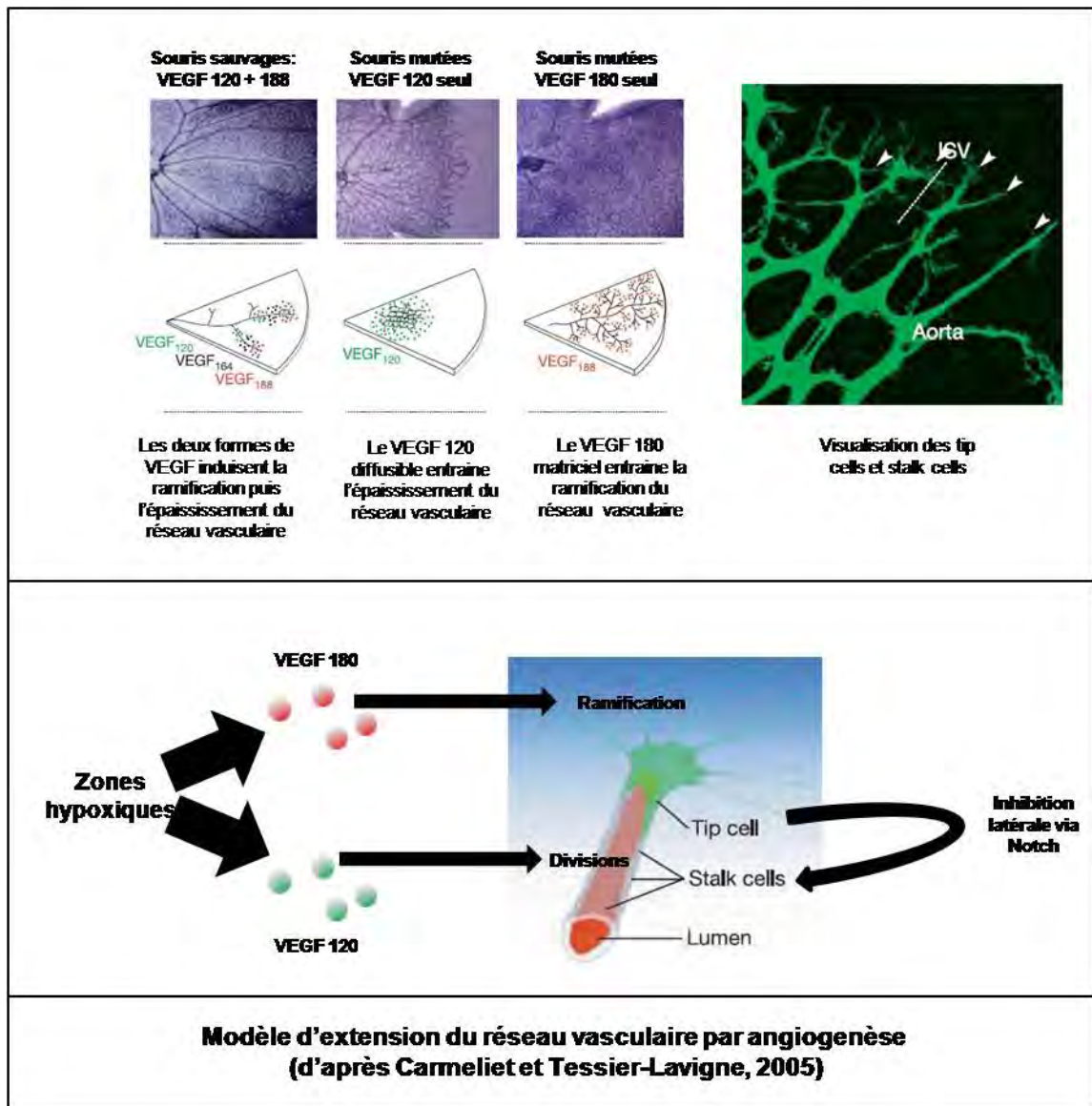
## Introduction : la vascularisation tumorale

---

le VEGF<sup>188</sup> se fixe à la matrice extracellulaire sous forme d'un gradient, qui est détecté par des cellules spécifiques au sein des cellules endothéliales, les « tip cells », qui développent des filopodes vers ce gradient de VEGF et migrent vers lui. En outre, le VEGF-A entraîne l'expression dans les « tip cells » de Dll4, un ligand qui active le récepteur Notch présent dans les cellules suivantes au sein du néo-vaisseau, empêchant celles-ci de devenir elles-aussi des cellules s'étendant et ramifiant le néo-vaisseau, pour au contraire devenir des cellules proliférantes : ce sont les « stalk cells », qui détectent quant à elles la quantité de VEGF<sup>120</sup> libre. Plus elle est importante, plus ces cellules se divisent, entraînant la formation du néo-vaisseau. (**Ruhrberg *et al.*, 2002, Gerhardt *et al.*, 2003, Hellström *et al.*, 2007**). Ces découvertes dans un modèle murin répondent à celles réalisées chez le poisson-zèbre (**Siekman *et Lawson*, Nature, 2007**).

A la suite de la mise en évidence de ce premier système de régulation de l'angiogenèse, plusieurs équipes ont abouti à la découverte récente que les quatre grands systèmes moléculaires de contrôle de la neurogenèse (le système netrine/DCC/Unc5, le système des sémaphorines, et enfin les systèmes Slit / Robo et éphrine) sont également impliqués dans le guidage des néo-vaisseaux. Ceci ouvre la possibilité que les concepts établis pour le guidage neuronal (contrôle à longue distance par des facteurs solubles, contrôle à courte distance par des molécules membranaires, interprétation différentielle des signaux suivant l'assortiment de récepteurs exprimé par la cellule migrante) s'avèrent également réguler la mise en place du système vasculaire (**Carmeliet *et Tessier-Lavigne*, 2005**).

# Introduction : la vascularisation tumorale



## La maturation des vaisseaux

Situation de départ

A l'issue de la phase d'angiogenèse, la vascularisation est constituée uniquement de cellules endothéliales, réparties entre quelques larges vaisseaux et le réseau de capillaires. La perfusion des tissus qui en résulte diminue l'activation du système « hypoxie / HIF / VEGF ». L'étape de la maturation vasculaire démarre. Elle est caractérisée par l'intervention de deux nouveaux acteurs caractéristiques des vaisseaux, les cellules murales et la matrice extracellulaire, et par les derniers remodelages aboutissant à l'architecture définitive de la vascularisation.

La mise en place de la matrice extracellulaire



## Introduction : la vascularisation tumorale

---

Dès les premiers jours du développement embryonnaire murin, on peut détecter la présence de fibronectine autour des principaux vaisseaux, comme l'aorte dorsale. Elle est renforcée par un dépôt de laminine (E8 pour l'aorte dorsale). (**Risau et Lemmon, 1988**)

Les modèles issus des cultures cellulaires suggèrent que la laminine polymérise initialement en se fixant sur les intégrines et les dystroglycanes à la surface des cellules. Ce premier dépôt sert de base à l'édification de l'échafaudage principal de collagène IV. La structure est ensuite renforcée par l'interaction du collagène IV avec d'autres molécules accessoires (perlecan, nidogène, etc.). Au final, la membrane basale se sera ainsi formée par auto-assemblage. (**Kalluri, 2003**).

Sa structure est compacte, et seule une partie de ses constituants est disponible pour interagir avec les cellules endothéliales, et stocker un grand nombre de facteurs pro-angiogéniques. A ce stade, les signaux émanant de la membrane basale favoriseraient essentiellement l'adhérence cellule/cellule et la sortie du cycle cellulaire (**Form et al., 1986**).

### Le recrutement des cellules mésenchymateuses

On peut observer (E10.5 pour la souris) un recouvrement progressif des vaisseaux par de nouvelles cellules, désignées collectivement comme « cellules murales », issues du mésenchyme, qui vont se différencier en péricytes (enveloppant de façon discontinue les vaisseaux) ou en cellules musculaires lisses (entourant les vaisseaux de calibre supérieur d'une à plusieurs couches de cellules). L'intervention de trois voies (PDGF, angiopoïétine-1, sphingosine-1-phosphate) a pu être démontrée par des modèles murins d'inactivation génétique. Tous sont compatibles avec la vasculogénèse mais provoquent des hémorragies massives, liées à un défaut dans la séquence conduisant au recouvrement des vaisseaux par les cellules murales, qui intervient plus ou moins rapidement (E9.5, 14.5, 16.5 suivant qu'on invalide respectivement Tie-2, EDG-1 ou PDGF-B).

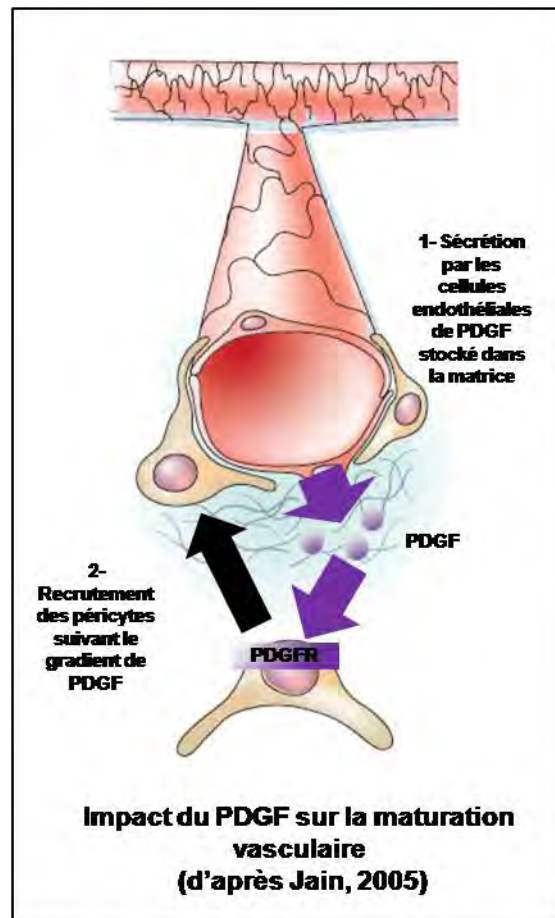
L'inactivation du PDGF-B conduit à des vaisseaux quasi-dépourvus de péricytes (**Lindahl et al., 1997**). Les cellules endothéliales qui les composent présentent de profondes anomalies: perturbation des jonctions cellules/cellules, hyperplasie, membrane luminale présentant des extensions anormales. Ceci explique en partie le caractère hémorragique de ces vaisseaux, dont le diamètre est par ailleurs extrêmement irrégulier, présentant des dilatations locales (la cause de ces micro-aneurismes pourrait être liée à une sur-prolifération des cellules endothéliales ou à des altérations systémiques du réseau vasculaire). De même, l'obstruction de la lumière des vaisseaux correspond aux défauts de perfusion expérimentale observés chez les animaux invalidés pour le PDGF ou le PDGFR (**Lindahl et al., 1997; Betsholtz, 2004**).

Un suivi détaillé des péricytes dans ce modèle a permis de démontrer l'existence de trois mécanismes de recouvrement des vaisseaux :

Dans la majorité des lits vasculaires, des pools de cellules mésenchymateuses sont disponibles à proximité des vaisseaux. Un facteur inconnu, vraisemblablement issu des cellules endothéliales, va conduire ces cellules mésenchymateuses à se masser par grappes contre les vaisseaux et à se différencier en cellules murales, en exprimant le PDGFR. Lorsque le PDGF est secrété par les vaisseaux, les cellules murales prolifèrent et migrent le long des vaisseaux. Ce mécanisme permet également à des vaisseaux ne disposant pas de cellules mésenchymateuses proches, comme c'est le cas pour les structures intracérébrales ou intracardiaques d'être recouverts, en provoquant une migration à longue distance de ces grappes initiales. Cette étude montre également les limites des fenêtres d'observation des souris invalidées génétiquement : en observant la vascularisation d'un système moins étudié, le foie, on s'aperçoit que les péricytes sont dans ce cas dépourvus de PDGFR

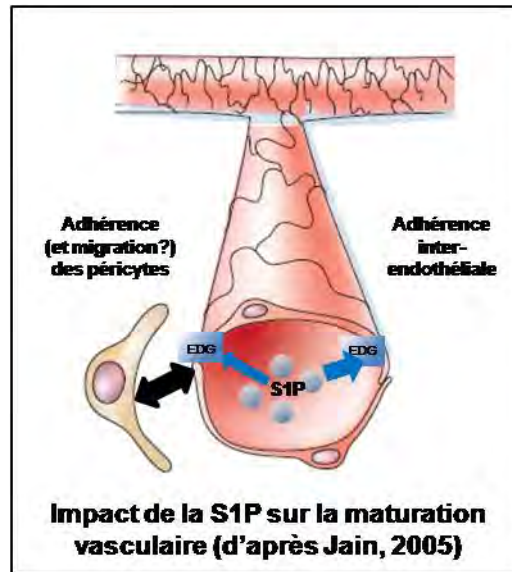
## Introduction : la vascularisation tumorale

et totalement indépendants du ligand PDGF dans leur migration de recouvrement (Hellström *et al.*, 1999).

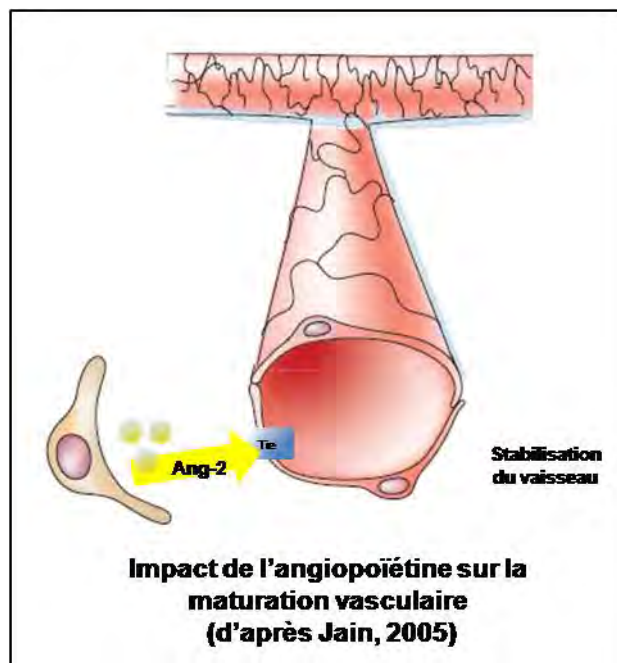


La suppression du récepteur de la sphingosine-1-phosphate, EDG-1, conduit à un défaut de recrutement des péricytes selon un mode original : les vaisseaux des animaux déficients ne sont pas totalement dépourvus de cellules murales, mais ceux-ci restent massés sur la face ventrale des vaisseaux, ne migrant pas pour recouvrir la face supérieure (Liu, JCI, 2000). En supprimant le récepteur spécifiquement dans l'endothélium, on obtient le même phénotype : la sphingosine-1-phosphate agit donc principalement en activant son récepteur EDG-1 sur les cellules endothéliales, celles-ci contrôlant par un mécanisme inconnu, peut être la répartition de la N-cadhérine (Paik *et al.*, 2004), la redistribution des cellules murales autour des vaisseaux.

## Introduction : la vascularisation tumorale



Dernier intervenant mis en évidence, le récepteur de l'angiopoïétine, Tie-2. Sa délétion, ou celle de son ligand, l'angiopoïétine-1, conduit à de graves anomalies de la maturation vasculaire (et cardiaque, qui serait la lésion critique expliquant pourquoi les embryons meurent si rapidement). Le mécanisme contrôlé par l'angiopoïétine reste incertain. Si les observations initiales (**Suri *et al.*, 1996**) indiquaient un défaut dans la stabilisation de l'interaction entre les cellules endothéliales, et les cellules murales ou la matrice extracellulaire se traduisant par des défauts dans l'épaississement des vaisseaux principaux, de leur ramification et de leur recouvrement péricytaire, ce modèle initial est discuté : le rôle principal de l'angiopoïétine pourrait être en effet d'assurer le passage de la vascularisation à un état non-perméant (**Uemura *et al.*, 2002**).



Interaction entre cellules endothéliales et péricytes :

Déclenchement de la voie TGF-B

## Introduction : la vascularisation tumorale

Après l'établissement du contact entre cellules murales et cellules endothéliales, les deux types cellulaires vont connaître des modifications importantes. Le système TGF- $\beta$  pourrait en contrôler la majorité, même si son mécanisme d'action est encore débattu.

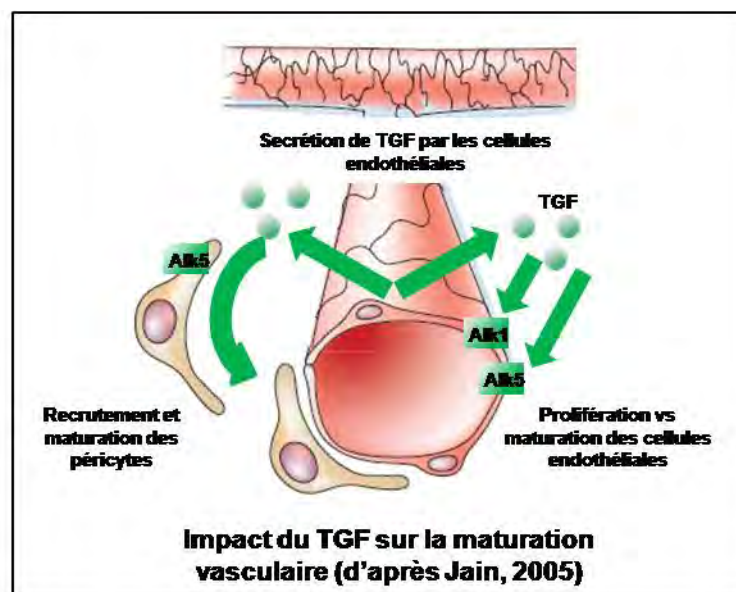
Les cellules endothéliales expriment deux types de récepteurs pour le TGF- $\beta$ , Alk-1 et Alk-5. Les cellules murales semblent, elles, ne posséder qu'Alk-5.

In vitro, l'action de ces deux récepteurs est opposée :

- Alk-1 semble capable d'induire la prolifération et la migration des cellules endothéliales, c'est à dire d'avoir une action pro-angiogénique
- Alk-5, au contraire, inhibe la migration et la prolifération des cellules endothéliales (**Goumans et al., 2002**), entraîne la différenciation des cellules murales en cellules musculaires lisses, et active la sécrétion de membrane basale (**Chambers et al., 2003**). Comme la co-culture entre cellules endothéliales et cellules murales active la sécrétion de TGF (**Sato et al., 1990** et **Hirschi et al., 1998**), on dispose là a priori d'une séquence d'évènements permettant la maturation vasculaire.

Deux grandes questions restent donc ouvertes dans l'intervention du TGF (**Rossant et Howard, 2002**) :

- Comment le TGF peut-il jouer activement des voies opposées dans un même type cellulaire, l'endothélium ? L'hypothèse actuelle est que les niveaux de TGF détermineraient cette alternance de réponse, les faibles niveaux engageant plutôt Alk-1, qui favorise l'angiogenèse et bloque Alk-5, tandis que des niveaux élevés de TGF activeraient plutôt la voie de maturation Alk-5 (**Goumans et al., 2002**).
- Les défauts de recouvrement péricytaire observés lors de l'inactivation de Alk-5 résultent-ils de défauts de la réponse au TGF dans les péricytes eux-mêmes, conformément aux résultats in vitro, ou d'un découplage de la signalisation endothéliale ? (**Gaengel et al., 2009**).



### Cellules murales et plasticité vasculaire :

L'interaction avec les cellules murales induit globalement la fin des capacités d'extension du réseau vasculaire. Mais réciproquement, le modèle rétinien laisse à penser qu'elle délimite également la fin du phénomène concurrent, la régression de certains vaisseaux, un mécanisme qui, comme expliqué précédemment, pourrait être déclenché par l'hyperoxie, peut-être en supprimant l'expression du VEGF. Les cellules murales fourniraient alors un signal de survie aux cellules endothéliales, et ce signal se substituerait au VEGF pour assurer la survie des cellules endothéliales. On aboutirait ainsi à

## Introduction : la vascularisation tumorale

---

un réseau stable, renforcé des cellules murales et de la matrice extracellulaire (**Benjamin et al., 1998**). Il est possible que l'enchaînement des événements soit encore plus abrupt : des travaux récents montrent qu'en présence de VEGF, l'action du PDGF ne peut s'exercer correctement pour aboutir à la maturation de la vascularisation (**Greenberg et al., 2008**).

Des modifications profondes séparent toutefois cette vascularisation du réseau final.

La spécialisation vasculaire

### *La différenciation EC organo-spécifique*

Parmi elles, l'acquisition par les cellules endothéliales de spécificités morphologiques propres à chaque organe, comme la fenestration des cellules endothéliales dans les glandes endocrines. Les systèmes permettant une telle régulation locale sont encore mal compris.

### *La différenciation veines/artères*

Le réseau vasculaire mature comporte des distinctions morphologiques très marquées entre le réseau artériel, allant du cœur vers les tissus, et dont les parois sont renforcées et élastiques, et le réseau veineux, assurant le retour au cœur, et dont les parois vasculaires sont plus fines et marquées par des valves. A nouveau, la décennie écoulée a marqué la transition de connaissances purement anatomiques à la compréhension des premières voies moléculaires gouvernant la mise en place d'un réseau différencié artères/veines.

On sait aujourd'hui que dans les cellules encore au stade de plexus, les futures cellules veineuses expriment un facteur de transcription, TF-Coup II, qui empêche ces cellules de se doter du récepteur Flk-1 et du co-récepteur Neuropilin-1, tous deux présents dans les cellules artérielles.

Le récepteur Flk-1 va induire dans les futures cellules artérielles la voie Notch, qui contrôle le facteur de transcription Gridlock, et permet ainsi l'expression de l'éphrine B2. A l'inverse, cet axe est bloqué dans les futures cellules veineuses, qui expriment le récepteur à l'éphrine B4. Le système éphrine B2/récepteur à l'éphrine B4 est connu pour permettre la mise en place de compartiments neuronaux distincts, et semble jouer ce rôle dans la mise en place des zones d'échange entre système artériel et veineux. Il se maintient dans la vascularisation adulte.

On ne sait pas si les voies de régulation initiales de ce système sont génétiques ou hémodynamiques (**Zhong et al., 2001, Jain, 2003, Le Noble et al., 2004, You et al., 2005**).

A l'issue de la vasculogénèse, de l'angiogénèse, et de la maturation des vaisseaux, un système vasculaire hiérarchisé (artères/artérioles/capillaires puis veinules/veines) et différencié (artériel vs veineux) est mis en place.

La structure de base de l'ensemble des vaisseaux est un agencement tubulaire et ramifié de cellules endothéliales, connectées à une membrane basale. Viennent s'y ajouter des cellules de soutien, dispersées dans les vaisseaux les plus fins, dits microvaisseaux, et de densité croissante dans les artérioles et les veinules. Elles forment, dans les vaisseaux principaux, veines et artères, une couche multicellulaire, nommée média, renforcée dans les artères par de l'élastine. Cellules endothéliales, membrane basale et cellules de soutien sont enveloppées, dans ces grands vaisseaux, par une enveloppe conjonctive, l'adventice.

Premier à être mis en place durant l'embryogénèse, le système vasculaire a pour caractéristique une très grande stabilité, et notamment une très longue survie des cellules endothéliales. Si la régulation de l'angiogénèse a fait l'objet de nombreuses études, permettant d'en définir les acteurs-clés, la maintenance de la vascularisation mature est moins bien cernée. Il a été récemment mis en évidence qu'une signalisation permanente du FGF est nécessaire au maintien de l'intégrité vasculaire, dans les

# Introduction : la vascularisation tumorale

---

artères comme les veines. Le FGF permet en effet d'assurer un contact étroit entre les cellules endothéliales, en régulant la présence de VE-cadhérine constituant les jonctions adhérentes et serrées (**Murakami et al., 2008**). De même, la S1P jouerait un rôle crucial dans le maintien de la barrière endothéliale (**Camerer et al., 2009**).

Seuls trois cas d'angiogenèse physiologique sont connus chez l'adulte : le renouvellement de la muqueuse génitale femelle, les organes en croissance continue, et enfin les tissus en cours de cicatrisation. De façon intéressante, ces sites de remaniement vasculaire ont permis de montrer l'intervention du système VEGF/Angiopoïétine :

Dans la vascularisation mature, l'Angiopoïétine-1 est constamment exprimée, stabilisant la vascularisation par activation de son récepteur endothélial Tie-2. Mais l'Angiopoïétine-2 est exprimée au niveau des sites de remodelage vasculaire actifs, comme le corpus luteum. En empêchant la fixation de l'Angiopoïétine-1, elle déstabilise l'interaction entre les vaisseaux et les cellules de soutien, ce qui conduit soit à une néo-angiogenèse, en présence de VEGF, soit une régression vasculaire s'il est absent (**Holash et al., 1999**).

### 3) La vascularisation tumorale : exploration et exploitation thérapeutique

Après avoir formulé l'hypothèse du lien entre tumeur et vascularisation en 1971, Folkman en apporta les premières preuves expérimentales en montrant comment des explants tumoraux provoquent la croissance de néo-vaisseaux lorsqu'on les implante dans des zones initialement avasculaires comme l'iris de lapin. Ces résultats sont prolongés en utilisant le même système expérimental à la fin des années 70 : l'implantation de cellules ou de biopsies humaines à différents stades du processus de tumorigénèse montre que la progression tumorale s'accompagne de l'acquisition de propriétés angiogéniques. C'est le principe du co-développement tumeur/vascularisation.

Mais des questions cruciales restaient alors ouvertes :

Quelle est la cause de l'activation de l'angiogenèse au cours de la progression tumorale ? La mutation initiale, ou des mutations ultérieures, ou même des voies de transduction préexistantes ?

Existe-t-il un moment précis durant la tumorigénèse où l'angiogenèse est activée ?

Enfin, par quels mécanismes est-il possible de réactiver l'angiogenèse alors que celle-ci est quasi inexistante dans les organismes adultes ?

Au début des années 80, répondre à de telles questions se heurte à nouveau à la méconnaissance générale des mécanismes de l'angiogenèse qui prévaut alors, mais aussi au manque de modèles tumoraux adaptés : comme l'explique Folkman (**Folkman et al., 89**), l'impossibilité d'obtenir des biopsies représentant de façon constante les mêmes étapes de la croissance tumorale, tout comme la grande imprédictibilité des modèles spontanés tumoraux chez l'animal, limite le décryptage de l'angiogenèse tumorale.

#### 1. Le modèle classique du switch angiogénique

##### ***Souris Rip/TAG et mise en évidence historique du switch angiogénique***

En 1980, les premières intégrations stables de transgène dans le génome murin sont réussies. Quatre ans plus tard, cette technologie permet la première expression in vivo d'un oncogène, l'antigène T, créant la lignée de souris dite RIP-Tag. Cette expression est restreinte aux cellules pancréatiques, qui

## Introduction : la vascularisation tumorale

---

se transforment progressivement, en passant par des stades histologiques caractéristiques et reproductibles : jusqu'à trois semaines après la naissance, les cellules  $\beta$  expriment le transgène sans modification phénotypique. Des zones hyperplasiques surgissent alors sporadiquement, jusqu'à atteindre la moitié des îlots, à 9 semaines et demi. Mais seuls 1 à 2% de ces îlots en surprolifération atteindront le stade de la tumeur. (Hanahan, 1985)

Dans l'intervalle séparant la prolifération accélérée du stade tumoral, une étape intermédiaire et systématique est isolée par Folkman. Elle ne touche qu'un îlot sur cinq, qui se dote alors d'une néo-vascularisation. Cette propriété est conservée lorsque l'on isole l'îlot pour effectuer un test sur des cellules endothéliales en culture, et son caractère aléatoire ne résulte donc pas d'une inhibition sélective par le microenvironnement.

Cette étude décrit ainsi pour la première fois les caractéristiques de l'acquisition d'une vascularisation par une tumeur : *quatre étapes* distinctes mais aléatoires scandant la progression tumorale sont repérables, et l'acquisition de propriétés angiogéniques en constitue une, le « switch angiogénique », se situant aux stades précoces du développement tumoral. Folkman déduit du caractère aléatoire de ce switch qu'il doit reposer sur l'acquisition de nouvelles propriétés par la tumeur. Ceci exclue la possibilité que ce switch angiogénique résulte de l'activation instantanée de voies de réponses présentes dans la cellule, que ces voies soient des voies de transduction classiques ou induites par les oncogènes.

Ce modèle semble confirmé par les deux modèles de souris transgéniques suivants (l'induction de fibrosarcomes, ou d'un carcinome par expression du papillomavirus respectivement dans les fibroblastes du derme ou les cellules basales de l'épiderme), où l'on note la présence du switch angiogénique avant la formation de la tumeur solide elle-même. L'apparition de la vascularisation tumorale a également été décrite par analyse des biopsies dans les cancers du sein ductal et du col de l'utérus. (Hanahan et Folkman, 1996)

### ***La recherche de l'expression d'un facteur pro-angiogénique : le modèle MM16***

L'étape suivante consistait à rechercher par quel mécanisme la tumeur pouvait induire cette néo-vascularisation. Dans la perspective qui prévalait suite aux travaux initiaux de Folkman, il s'agissait de trouver un facteur pro-angiogénique, qui serait synthétisé ou au moins libéré par les cellules tumorales. Dans le modèle de fibrosarcome évoqué auparavant (souris K14-HPV16), on constate effectivement que les deux facteurs pro-angiogéniques VEGF et aFGF sont brusquement exprimés entre les premières étapes hyperplasiques et l'apparition de lésions de hauts grades (Arbeit et al., 1996, cité dans Hanahan et al., 1996).

### ***Les étapes détaillées : les apports de la surexpression du VEGF A***

La description détaillée du remodelage des vaisseaux accompagnant la surexpression du VEGF-A dans différents tissus murins a complété ce modèle. Initialement, les capillaires se dilatent sous l'effet du VEGF. Les protéines plasmatiques qui se déposent ainsi forment une matrice transitoire, tandis que la membrane basale et la matrice extracellulaire sont dégradées localement. Les cellules endothéliales utilisent la matrice transitoire pour migrer en direction du stimulus angiogénique. Puis elles se multiplient et se réorganisent en un nouveau réseau vasculaire (Petterson et al., 2000, analysé dans Bergers et Benjamin, 2003).

# Introduction : la vascularisation tumorale

---

Ainsi se trouve défini le switch angiogénique classique: en adéquation avec le modèle de la mutation somatique, la tumeur activerait des gènes nouveaux et se doterait ainsi d'une vascularisation, par le biais d'un facteur pro-angiogénique, conformément à l'hypothèse de Folkman.

Ce modèle sert de base aux modèles actuels, qui en soulignent la complexité : le processus angiogénique vient s'exercer sur une structure de cellules endothéliales jointives, connectées à une lame basale par des intégrines, enserrées dans une matrice extracellulaires, et sous le contrôle des péricytes. Il faut donc modifier l'ensemble de ces structures pour permettre l'émergence d'une nouvelle extension vasculaire :

Relâcher l'association avec les péricytes, digérer ou modifier lame basale et matrice extracellulaire, altérer les relations cellules/cellules, déterminer quelles cellules seront des tip-cells, et dans celles-ci, inverser la polarité prévalant dans les vaisseaux, et passer à un phénotype propice à la migration. Il semble que les systèmes de détermination VEGF/Dll/Notch interviennent dans l'angiogenèse tumorale, mais on connaît mal l'implication du gradient de VEGF, et des systèmes de guidage, étudiés dans l'angiogenèse physiologique. De même, la rencontre entre tip cells pour former un pont vasculaire pourrait impliquer les systèmes éphrine contrôlant la différenciation artéro-veineuse. La formation d'une lumière est, elle aussi, mal élucidée, même si l'on suspecte qu'elle pourrait faire intervenir une fusion de vacuoles.

Enfin, l'ensemble de ces altérations doit être inversé une fois la vascularisation établie : reformation de la lame basale, dépôt d'une nouvelle matrice, interaction avec les péricytes. La perfusion au sein du nouveau réseau pourrait jouer un rôle modulateur, même si les vaisseaux tumoraux comportent fréquemment des altérations (**Adams et Alitalo, 2007**).

Mais des limites dans ce modèle vont se faire jour à travers trois axes d'études : l'existence de facteurs anti-angiogéniques, et l'existence de mécanismes alternatifs tant pour l'induction de l'angiogenèse que pour sa réalisation proprement dite.

## 2. Limites et alternatives au modèle classique du switch angiogénique

### ***La première limite : les facteurs anti-angiogéniques***

En 1990, l'équipe de NP Bouck identifie ce qui apparaît initialement comme un gène suppresseur de tumeur, c'est-à-dire dont la perte entraîne la transformation des cellules affectées. Mais l'identification du gène responsable conduit à une découverte surprenante : ce gène code pour la protéine thrombospondine-1, qui est dotée d'une forte activité anti-angiogénique (**Rastinejad et al., 1989, Good et al., 1990**). Il existe donc des facteurs anti-angiogéniques naturels, au même titre que les facteurs pro-angiogéniques postulés par Folkman., et dont la perte accompagne la transformation de certaines lignées cellulaires. De plus, des lignées cellulaires tumorales montrent une expression de la thrombospondine-1 inversement proportionnelle à leur degré de malignité (**Zabrenetsky et al., 1994**), tout comme la baisse d'expression de la thrombospondine-1 accompagne la progression tumorale dans un modèle de carcinome chimio-induit (**Hawighorst et al., 2001**). Dans les souris invalidées pour p53, l'apparition spontanée d'ostéosarcomes est accélérée par l'inactivation génétique de la thrombospondine-1, qui simule sa perte au cours du processus de tumorigénèse (**Lawler et al., 2001**).



## Introduction : la vascularisation tumorale

---

Ces données ont conduit à reconsidérer à la fois les mécanismes régulant l'angiogenèse physiologique et ceux gouvernant le switch tumoral: les deux pouvaient être activés tant par baisse des facteurs anti-angiogéniques que par la hausse des facteurs pro-angiogéniques. Cette hypothèse de la balance fournit également un cadre d'explication pour la présence de microenvironnements comme le pancréas, où la quantité de facteurs pro-angiogéniques (en l'occurrence, VEGF et EGF) sécrétée constitutivement est forte, sans que pour autant que l'angiogenèse y soit activée.

Enfin, ce modèle a connu une extension récente, avec la découverte de systèmes de régulation de la biodisponibilité des facteurs, comme :

- la capacité de certains éléments de la matrice extracellulaire à fixer les facteurs pro-angiogéniques, qui permet une libération rapide de ces derniers. L'étude du modèle canonique des souris RIP-Tag a abouti à une conclusion étonnante : tant le VEGF que ses récepteurs, et le aFGF sont exprimés à des niveaux élevés et invariants au cours du switch angiogénique (**Christofori et al., 1995, Hanahan et al., 1996**). Mais au cours du switch angiogénique, la métalloprotéase MMP-9 est exprimée dans les îlots pancréatiques, permettant la libération du VEGF qui est sécrété abondamment dans ce microenvironnement et stocké en interagissant avec la matrice (**Bergers et al., 2000**).

- l'existence d'inhibiteurs de l'angiogenèse cryptiques, c'est-à-dire libérés par clivage protéolytique de macromolécules circulantes et abondantes (donc à même de maintenir un contrôle systémique de l'angiogenèse), comme la fibronectine ou le plasminogène.

### ***La deuxième limite : le retour de mécanismes d'induction éliminés par les premiers modèles murins***

#### **L'angiogenèse sous contrôle des oncogènes**

La seconde limite au modèle du switch angiogénique classique provient de l'étude des causes mêmes de son activation. La possibilité d'une activation directe du switch angiogénique par les oncogènes avait été mise de côté suite aux résultats obtenus dans le modèle Rip-TAG.

Pourtant, l'expression forcée de Ras dans diverses lignées épithéliales non-tumorigènes induit l'expression du VEGF (**Rak et al., 1995, cité dans Rak et Yu, 2004**), et à l'inverse la perte de p53 s'accompagne d'une chute de l'expression de la thrombospondine-1 dans les fibroblastes (**Dameron et al., 1994**). Depuis ces études pionnières, plus d'une vingtaine d'oncogènes se sont avérés capables d'induire l'expression du VEGF dans des systèmes de lignées cellulaires (**Rak et Yu, 2004**).

Un pas supplémentaire est franchi avec l'utilisation d'un modèle murin déficient pour Ink4a, dans lequel les mélanomes se développent spontanément. Si l'on inhibe Ras par un système Tet-off, la vascularisation de la tumeur, et cette dernière, régresse. Ainsi, un oncogène est capable activé est capable de conditionner le maintien de la vascularisation tumorale.

Enfin, en utilisant le modèle murin de surexpression de Myc restreinte au pancréas, on peut (si l'on inhibe génétiquement la vague d'apoptose consécutive à la sur-prolifération des cellules tumorales) mettre en évidence le développement d'une vascularisation tumorale extrêmement rapide, ce qui exclue la possibilité qu'une lésion secondaire ait le temps d'intervenir pour activer le switch angiogénique dans ce modèle (**Pelengaris et al., 2002**). Il semble que l'expression rapide de l'IL-1  $\beta$  par les cellules tumorales, et l'activation consécutive de la MMP9 qui libère le VEGF matriciel, puisse médier pour partie cet effet (**Shchors et Evan, 2007**).

Ces résultats sont renforcés par ceux de l'équipe de Weinberg, qui montre que dans des cellules épithéliales, l'activation de Ras entraîne l'expression du VEGF, mais qu'en plus, passé un seuil

# Introduction : la vascularisation tumorale

---

d'activation, celle-ci s'accompagne d'une baisse d'expression de la thrombospondine-1, ce qui permet la croissance des tumeurs générées par l'injection de ces cellules. On retrouve le concept d'« oncogene induced angiogenesis », d'angiogenèse contrôlée par les oncogènes, avec en plus la possibilité que l'hypothèse de la balance entre facteurs pro et anti-angiogéniques puisse s'y appliquer (**Watnick et al., 2003**).

## La part de l'hypoxie

La réponse à l'hypoxie occupe une place assez paradoxale dans les mécanismes susceptibles de contrôler la néo-vascularisation tumorale. En effet si, nous l'avons vu, son rôle est largement reconnu dans le développement embryonnaire de la vascularisation, il n'en est pas de même pour la vascularisation tumorale : les modèles de souris transgéniques l'ont très largement exclue du champ de leurs investigations. Si l'on considère comme acquis le principe qu'une tumeur, en croissant, devient hypoxique naturellement, et que l'hypoxie permet d'engager le développement de la néo-vascularisation, les études le fondant expérimentalement sont assez limitées.

Certes, l'implication de HIF- $\alpha$ , le relais entre hypoxie et néo-angiogenèse, dans le développement tumoral est très claire : HIF- $\alpha$  est exprimé dans de très nombreuses biopsies de tumeurs (**Harris, 2002**). Mais une telle observation est insuffisante pour impliquer l'hypoxie, car HIF- $\alpha$  représentant un interrupteur puissant, capable d'activer de façon coordonnée de nombreux facteurs pro-angiogéniques, de nombreuses cellules tumorales pourraient le déréguler au cours de leur progression sans que l'hypoxie ne joue un rôle causal pour autant.

Pour étudier une intervention directe de la réponse à l'hypoxie, diverses approches ont été tentées :

- en utilisant le modèle des sphéroïdes multicellulaires : ces amas de cellules gliomales simulent, en culture, des tumeurs avasculaires. Les couches internes de tels amas subissent des conditions d'hypoxie chroniques, et surexpriment le VEGF. Ce phénomène est aboli si l'on expose les sphéroïdes à une atmosphère enrichie en O<sub>2</sub>. En outre, lorsqu'on les implante dans les souris, les sphères développent une vascularisation ou nécrosent. Si la néo-vascularisation est suffisante pour que la tumeur survive, le VEGF revient à son niveau initial d'expression, un indice fort d'une réponse contrôlée par les niveaux d'oxygène disponibles. (**Schweiki et al., 1995**)

- en greffant des cellules d'hépatocarcinomes ou des cellules ES à des souris. Cela conduit à des tumeurs avasculaires et fortement entravées dans leur croissance si l'on y invalide le système HIF. (**Maxwell et al., 1997 et Carmeliet et al., 1998**).

Même s'il ne s'agit que de modèles de xénogreffes, ils permettent la manipulation des cellules injectées, et fournissent des images convaincantes de l'apparition coordonnée des zones d'hypoxie et d'induction de la réponse HIF (**Moeller et al., 2004**), ce qui plaide pour une possible implication de l'hypoxie dans le développement de la vascularisation tumorale.

## ***La troisième limite : des mécanismes de vascularisation alternatifs***

### L'intervention des progéniteurs endothéliaux :

Les études sur les mécanismes de l'angiogenèse, physiologique comme tumorale, se sont concentrées sur les mécanismes de remodelage des vaisseaux préexistants. Mais la mise en évidence

## Introduction : la vascularisation tumorale

---

de l'existence de précurseurs des cellules endothéliales (**Asahara et al., 1997**) a ouvert la possibilité que ces progéniteurs puissent participer à l'élaboration des vaisseaux naissants dans la tumeur.

Les bases du mécanisme ont été détaillées en utilisant des souris présentant une délétion du gène *Id*, empêchant la croissance des tumeurs xénogreffées. La croissance de ces tumeurs peut être rétablie par un transfert de moelle osseuse issue de souris saines. Les progéniteurs endothéliaux, dont l'apparition serait bloquée par la perte de *Id* (**Ciarrochi et al., 2007**) semblent mobilisés, via le récepteur VEGFR2, dans la circulation sanguine, grâce au VEGF émis abondamment par la tumeur, et s'intégrer en quantités importantes dans les néo-vaisseaux tumoraux (**Lyden et al., 2001**).

Toutefois, l'importance de ce phénomène, voire son existence même (**Purhonen et al., 2008** par exemple), reste aujourd'hui encore très controversée. De nombreuses explications ont été proposées pour expliquer ces disparités retrouvées tant dans les modèles de tumeurs xénogreffées que dans les modèles de souris transgéniques:

- à la multiplicité des dispositifs expérimentaux, souvent retrouvée dans les études de l'oncogénèse, s'ajoutent ici spécifiquement des réévaluations constantes des techniques utilisées, portant notamment sur la pertinence des assortiments de marqueurs caractérisant ou non les précurseurs endothéliaux, et sur l'impact des techniques de transplantation sur le nombre et le comportement de ces précurseurs.

- la plus forte dépendance des modèles de tumeurs xénogreffées des progéniteurs endothéliaux comparée aux tumeurs spontanées (**Ruzinova et al., 2003**), l'attractivité variable des tumeurs suivant leur origine, et au cours de leur développement (**Nolan et al., 2007**) pourraient contribuer à ces résultats incertains.

L'intervention des progéniteurs endothéliaux dans la mise en place initiale de la vascularisation tumorale reste donc débattue, mais deux études en ont étendu les enjeux :

- en montrant qu'un petit nombre de cellules progénitrices pouvaient jouer un rôle clé en infiltrant les micrométastases, et en y exerçant une forte activité pro-angiogénique, conditionnant la génération des macrométastases (**Kaplan et al., Nature, 2005**)

- en montrant qu'un traitement détruisant les vaisseaux sanguins, comme la combréstatine, conduit à une augmentation brusque et transitoire du nombre de progéniteurs endothéliaux circulant, qui s'accumulent dans les fractions tumorales survivant au traitement (**Shaked et al., 2006**)

### **Holash et la cooptation**

En 1999, une étude vient ébranler une autre base du switch angiogénique classique, celle de la croissance initiale des tumeurs sous forme de masses avasculaires, qui acquièrent ultérieurement une vascularisation. En observant la localisation de cellules gliomales injectées dans le cerveau de rat, il est démontré qu'elles se localisent préférentiellement au niveau des vaisseaux cérébraux préexistants, qu'elles « cooptent ». Ceci leur permet une phase initiale de croissance sans déclencher de processus angiogénique. On postule alors qu'il pourrait s'agir d'un mécanisme étendu à un grand nombre de tumeurs. (**Holash et al., 1999a et b**)

Si le modèle semble approprié pour le gliome (on retrouve un certain nombre de caractéristiques moléculaires et morphologiques décrites pour le modèle C6 dans les biopsies de gliomes humains), il n'est pas évident d'en étendre le domaine de validité. Le mécanisme est observé également si l'on injecte dans le cerveau des cellules d'adénocarcinomes au lieu des cellules gliales (**Holash et al., 1999a**), ou des carcinomes mammaires en sous-cutané, chez le rat ou la souris (**Li et al., 2000**). En outre, dans cette dernière étude, le suivi des cellules tumorales fluorescentes et injectées dans des chambres dorsales permet de montrer une migration de ces cellules en direction des vaisseaux préexistants. Mais chacun des modèles utilisés repose sur l'injection de cellules tumorales isolées et

## Introduction : la vascularisation tumorale

---

très agressives, et simule donc plus la pousse de micrométastases (on retrouve d'ailleurs le mécanisme de cooption dans le modèle de métastase pulmonaire après injection intra-vasculaire de cellules de carcinomes) que l'essor d'une tumeur initiale.

Cependant, si la portée de ce modèle de « cooption vasculaire » est peut-être limitée en termes de nombre de tumeurs touchées, il a permis de replacer le rôle de l'angiopoïétine dans l'angiogenèse tumorale, aux côtés de l'acteur moléculaire le plus fréquemment étudié, le VEGF. En effet, les cellules tumorales, en se développant autour des vaisseaux, entraînent rapidement leur déstabilisation, correspondant à une sécrétion d'Angiopoïétine-2. Tout autour, les cellules tumorales subissent une phase de pertes massives, avant d'activer la production de VEGF : dans ce processus qui rappelle alors le switch angiogénique, l'association entre Angiopoïétine-2 et VEGF permet, comme dans les processus physiologiques décrits plus haut, de basculer vers une néo-angiogenèse et la progression tumorale.

### ***Des modèles généraux donc alternatifs ou valables localement ?***

Le modèle général qui émerge de ces différents travaux, mais qui reste à fonder (il est toujours difficile de distinguer, en oncogenèse, ce qui relève de la variabilité des modèles utilisés de la variabilité des tumeurs elles-mêmes), est celui d'une interaction étroite entre la tumeur et le microenvironnement dans lequel elle se développe :

Ainsi, certains parenchymes hautement vascularisés semblent propices à l'intervention de la cooptation vasculaire, comme le cerveau.

Les tumeurs dépendantes de certains oncogènes, comme Myc, peuvent voir leur programme angiogénique directement activé, tandis que les autres se heurteront à l'hypoxie et à la déprivation, et n'y survivront que par des mécanismes de réponses directes, comme HIF, ou des mutations, activant au final le programme angiogénique.

Quelle que soit l'origine de l'activation du mécanisme angiogénique, la mise en place de ce dernier sera conditionnée par les ressources locales qui s'offrent à la tumeur. Ainsi, un microenvironnement riche en facteurs pro-angiogéniques stockés dans la matrice extracellulaire, comme les îlots pancréatiques, ou plus pauvre, comme le derme, ne permettent pas la mise en place des mêmes mécanismes d'angiogenèse tumorale, alors même que l'oncogène activé est identique : dans le pancréas, la sécrétion d'IL-1 qui accompagne l'activation de Myc confère un avantage direct, permettant la mobilisation des stocks de VEGF matriciels. Mais dans le derme, on assiste à une coopération entre Myc, l'oncogène activé, et les voies de réponse à l'hypoxie, dans le contrôle de la sécrétion du VEGF.

Il pourrait en aller de même pour le recrutement des précurseurs, mais aussi pour l'intervention du système inflammatoire : les cellules inflammatoires qui s'infiltrent sur le site tumoral peuvent non seulement libérer de façon massive des facteurs pro-angiogéniques, mais aussi des métalloprotéases susceptibles d'altérer la qualité de la membrane basale et de favoriser la migration des cellules endothéliales, ainsi que de libérer les facteurs pro-angiogéniques stockés dans la matrice extracellulaire. (Résumé dans **Cao *et al.*, 2008**). Elles peuvent donc constituer un puissant levier jouant sur les étapes essentielles de l'angiogenèse classique. Un tel mécanisme a pu être illustré dans le modèle des tumeurs pancréatiques Myc-induites, où le recrutement des cellules mastocytaires (venant relayer le mécanisme dépendant de l'IL-1 décrit auparavant) est indispensable à une angiogenèse et une croissance tumorale soutenues (**Soucek *et al.*, 2007**)

# Introduction : la vascularisation tumorale

---

Il est donc possible que la qualité des programmes oncogéniques soit filtrée par le microenvironnement local, tout en gardant à l'esprit que ce dernier peut être lui-même profondément remanié sous l'influence de la tumeur.

## 3. Les caractéristiques de la vascularisation tumorale

### ***Caractéristiques cellulaires de la vascularisation tumorale et conséquences tissulaires***

La vascularisation tumorale présente des anomalies structurales et fonctionnelles. La vascularisation tumorale est hautement désorganisée (**Carmeliet et Jain, 2000**)

- on n'y retrouve pas la hiérarchisation classique de l'arbre vasculaire, avec des diamètres décroissants des artères aux artérioles puis aux capillaires, avant de s'élargir à nouveau. Les vaisseaux tumoraux présentent de nombreuses variations de diamètres, sans ordre apparent.

- De même, le schéma de recouvrement péricytaire typique des vaisseaux est altéré, au profit d'un recouvrement péricytaire très variable (et discuté, la vision prévalente d'une absence massive de péricytes étant très débattue - **Morikawa et al., 2002**), de type capillaire, mais avec en outre des altérations dans l'expression des marqueurs cellulaires habituels. En outre, les péricytes présentent fréquemment des zones d'association lâches avec les vaisseaux.

- le réseau vasculaire présente fréquemment des taux anormaux de branchements, voire des shunts de la circulation

- la lame basale à laquelle adhèrent les cellules endothéliales est elle-même altérée. Ainsi, dans les cancers pancréatiques des souris Rip-Tag, elle présente des perforations, des zones à couches multiples, et d'autres où l'association avec les cellules endothéliales est lâche (**Baluk et al., 2003**).

A l'échelle des cellules endothéliales, des traits caractéristiques sont également visibles :

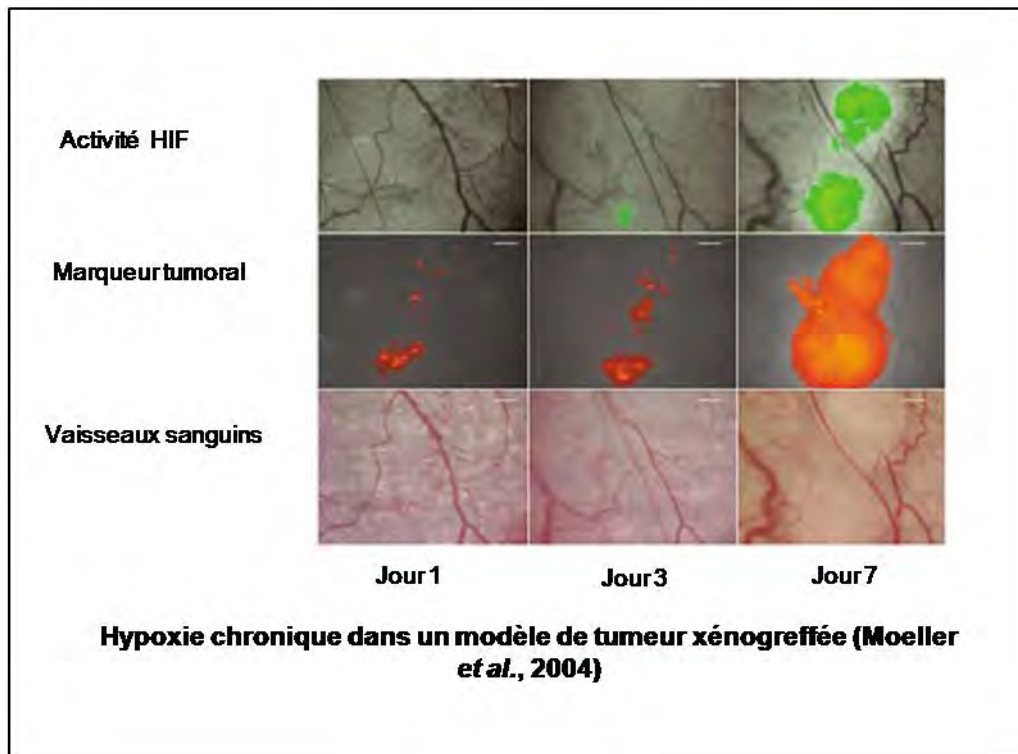
- elles présentent des défauts dans leurs jonctions les unes aux autres

- elles peuvent présenter des zones de surprolifération

- leur perméabilité est accrue

Hémorragique et désordonnée, la vascularisation tumorale présente donc une perfusion sévèrement altérée, résultant de l'éloignement de la tumeur par rapport à l'approvisionnement vasculaire, et qui est illustrée dans le modèle ci-dessous :

## Introduction : la vascularisation tumorale



A cette hypoxie chronique, vient se surajouter une hypoxie cyclique, issue elle des variations dans la qualité de la circulation à l'intérieur des vaisseaux tumoraux.

Elle crée des zones fortement hypoxiques, mais également déprivées en nutriment. Dans ces zones hostiles à la survie des cellules, les cellules tumorales basculent fréquemment vers un métabolisme glycolytique (qui est en outre un des sous-programmes fréquemment activés par les oncogènes **Hsu et Sabatini, 2008**), et le drainage faible (accentué parfois par des défauts dans la lymphogénèse) conduit à une acidification du microenvironnement, ainsi qu'à une augmentation de la pression interstitielle intra-tumorale (**Padera et al., 2004**).

Une précision doit cependant tempérer cette description : la vascularisation tumorale est fréquemment présentée comme anormale, totalement dérégulée, mais lorsque l'on module le système qui régule l'extension des réseaux vasculaires (le système Dll4/Notch, présenté pour son intervention dans le développement physiologique de la vascularisation), on constate que le réseau vasculaire tumoral n'est pas un simple réseau anarchique : il présente un degré modéré d'organisation (**Noguera-Troise et al., 2006**).

### **Les causes possibles :**

L'explication de ces caractéristiques de la vascularisation tumorale a été abordée d'abord dans le cadre de la balance entre facteurs pro et anti-angiogéniques. On considère que le déséquilibre nécessaire à l'angiogénèse est si accentué durant le développement de la tumeur qu'il l'altère. Quelles sont les bases de ce concept ?

### **Le surdosage du VEGF :**

Naturellement, l'hypothèse d'un déséquilibre entre les différents facteurs modulant l'angiogénèse a principalement été développée par rapport au VEGF, qui est non seulement le facteur pro-angiogénique dont le rôle a été le plus étudié au niveau physiologique, mais aussi celui pour lequel

## Introduction : la vascularisation tumorale

---

l'importance des problèmes de dosage a la mieux été démontrée : des anomalies du développement surviennent, que le VEGF soit en défaut, dans les animaux hétérozygotes (**Carmeliet et al., 1996**), ou en excès, par surexpression à partir de son propre locus (**Miquerol et al., 2000**). En outre, le VEGF est sécrété dans un nombre extrêmement élevé de tumeurs en quantités élevées.

En utilisant un système d'expression contrôlée du VEGF in vivo, il apparaît que si, pour des concentrations modestes de VEGF sécrété, les vaisseaux néoformés possèdent une taille normale, recrutent normalement les péricytes et deviennent indépendants du VEGF, lorsque les concentrations augmentent, les vaisseaux deviennent dilatés, échouent à s'entourer de péricytes, et restent dépendants du VEGF, autant de caractéristiques de vaisseaux immatures (**Ozawa et al., 2004**). Plus intéressant, le système permet de démontrer que ce n'est pas la quantité totale de VEGF sécrété dans le tissu qui détermine le seuil à partir duquel les vaisseaux anormaux apparaissent, mais la concentration locale de VEGF. Ce résultat est tout à fait en phase avec la nécessité de la présence d'un gradient de VEGF pour l'établissement correct d'un réseau vasculaire tel que montré dans la rétine (**Ruhrberg et al., 2002**). Outre l'explication par la rupture d'un gradient de VEGF, les récents résultats obtenus par l'équipe de David Cheresch montrent que le VEGF pourrait inhiber la signalisation du PDGFR, cruciale, nous l'avons vu, dans la maturation vasculaire (**Greenberg et al., 2008**).

L'autre facette de la balance, c'est-à-dire une anomalie dans la sécrétion des facteurs anti-angiogéniques lors de la croissance des tumeurs et notamment de la mise en place de la vascularisation, est moins bien comprise, ne serait-ce que parce que peu de données sont disponibles sur le rôle physiologique des facteurs anti-angiogéniques. De même, si le manque de « terminaison » de la séquence est fréquemment évoqué, seule une molécule semble à l'heure actuelle pouvoir jouer un tel rôle : la vasohibin. Découverte en criblant les gènes induits par l'action du VEGF sur les cellules endothéliales, la vasohibin est capable d'inhiber fortement l'angiogenèse (**Watanabe et al., 2004**), notamment en inhibant l'expression du VEGFR2 dans le modèle rétinien (**Shen et al., 2006**). Et, au moins in vitro, cette boucle d'inhibition de la signalisation induite par le VEGF semble inhibée dans des conditions hypoxiques ou pro-inflammatoires, courantes dans les tumeurs. Mais pour l'heure, les résultats sont insuffisants pour montrer qu'un défaut d'intervention de la vasohibin joue un rôle causal dans les anomalies de la vascularisation tumorale, et ce d'autant plus que son expression a récemment été montrée dans des prélèvements tumoraux (**Yoshinaga et al., 2008**).

### Les problèmes de maturation :

Au cours du développement physiologique de la vascularisation, une phase de maturation, caractérisée par le recouvrement des vaisseaux par des péricytes, succède à la phase de ramification des vaisseaux. Le phénotype des vaisseaux dans lequel cette maturation est entravée, notamment en bloquant l'axe PDGF/PDGFR, présente de nombreux points communs avec celui des vaisseaux tumoraux : anomalie dans le recouvrement péricytaire, vaisseaux de diamètres variés et perméants...

Un défaut dans les facteurs gouvernant cette maturation pourrait-il être à l'origine de ces anomalies vasculaires ? Ou, réciproquement, l'expression de ces facteurs de maturation permet-elle une normalisation du réseau vasculaire tumoral dans les systèmes expérimentaux ?

Le système le plus simple pour étudier la place de la maturation consiste à étudier le développement de tumeurs xénogreffées suivant ou non qu'elles expriment le PDGF. La production de PDGF par des cellules de cancer colorectal ou pancréatique entraîne une augmentation de la couverture péricytaire des vaisseaux (**McCarty et al., 2007**). Ceci bloque l'angiogenèse tumorale, stabilisant les microvaisseaux, un résultat tout à fait conforme avec un défaut de maturation des vaisseaux tumoraux.

## Introduction : la vascularisation tumorale

---

Mais la situation pourrait être plus difficile à cerner ; en effet de nombreuses tumeurs expriment de nombreux facteurs de croissance au-delà du VEGF, notamment le PDGF. Dans les souris HPV/E2 modélisant le cancer du col de l'utérus, ces tumeurs sécrètent de façon basale du PDGF, et présentent une faible couverture péricytaire. L'inhibition conduit à une baisse encore accrue du recrutement des péricytes (**Pietras et al., 2008**). L'idée d'une activation au moins faible de cette voie de maturation est confirmée par des résultats similaires dans les modèles de souris Rip-Tag et LLC (**Sennino et al., 2007**). Les anomalies de la vascularisation tumorale pourraient-elles, au total, résulter d'une production faible ou nulle de PDGF ?

La réalité pourrait s'avérer plus complexe :

D'abord, parce que les cellules tumorales ne sont pas les seules sources possibles de PDGF. Or, le PDGF sécrété par les cellules endothéliales se fixe sur la matrice environnante selon un gradient qui pourrait être critique pour pousser les cellules péricytaïres à s'associer aux vaisseaux. Lorsque les tumeurs sont les productrices du PDGF, les cellules péricytaïres pourraient recevoir un signal de prolifération, mais dépourvues d'un gradient les guidant vers les cellules endothéliales, rester à distance des cellules endothéliales, donc ineffectives (**Abramsson et al., 2003**). (Pourquoi, dans certains modèles comme les précédents, la surexpression du PDGF dans les tumeurs semble suffisante pour induire le recrutement péricytaire n'est pas expliqué.)

Ensuite, parce que lorsque les tumeurs produisent des combinaisons de facteurs pro-angiogéniques, les actions biologiques individuelles de chaque facteur pro-angiogénique peuvent être singulièrement modulées. Ainsi, une tumeur surexprimant le PDGF, et le FGF2, un facteur clé dans l'entretien de la vascularisation mature, ne possède pas pour autant une vascularisation mature : le FGF2 à forte dose induit en effet l'expression du PDGFR sur les cellules endothéliales, qui en sont habituellement dépourvues, et prolifèrent massivement sous l'effet du PDGF, qui par ailleurs échoue à recruter les péricytes dans ce modèle (**Nissen et al., 2007**).

L'angiopoïétine, second grand système contrôlant la maturation physiologique, possède un rôle distinct suivant l'isoforme étudiée :

- l'angiopoïétine-2 est abondamment exprimée dans les tumeurs hautement angiogéniques. Mais son action est, au contraire des facteurs de maturation, de déstabiliser la couverture péricytaire des vaisseaux, permettant la division des cellules endothéliales durant l'angiogenèse.

- l'angiopoïétine-1 est rarement exprimée dans les tumeurs. Son expression forcée dans des tumeurs xénogreffées fournit toutefois une information importante, déjà montrée avec le PDGF : en induisant un recrutement poussé des péricytes, elle aboutit à une vascularisation stabilisée, non perméante, non proliférante, donc très réfractaire au déclenchement de toute angiogenèse, et finalement empêchant la croissance tumorale (**Tian et al., 2002**).

Ainsi, si un déficit de maturation semble à même d'expliquer une partie des caractéristiques de la vascularisation tumorale, les bases moléculaires de ce phénomène pourraient être plus complexes encore que celles de la maturation physiologique, en superposant au jeu des trois facteurs classiques PDGF, Ang-1 et S1P divers facteurs angiogéniques ou permettant l'entretien de la vascularisation mature. En plus de cette interaction, le développement tumoral se trouve soumis à deux contraintes divergentes :

- une pression de sélection qui favorise les variants développant rapidement une vascularisation. Ceci aboutit fréquemment à des réseaux vasculaires denses et immatures. L'étape de maturation empêche en effet l'angiogenèse.



# Introduction : la vascularisation tumorale

---

- la nécessité d'une certaine efficacité dans la perfusion, qui suppose une stabilisation du réseau vasculaire, mais qui peut donc aboutir à une vascularisation quiescente incapable de soutenir la croissance tumorale.

## Les défauts de guidage vasculaire :

Le schéma très irrégulier de la vascularisation tumorale laisse également supposer qu'il pourrait exister un défaut dans le guidage des néo-vaisseaux, soit comme évoqué auparavant, en raison d'un défaut dans la signalisation liée au VEGF, soit par une dérégulation des systèmes de guidage partagés avec le système nerveux.

## 4) Une nouvelle approche thérapeutique? Promesses et limites des thérapies anti-angiogéniques

Quand Folkman énonça les premiers concepts théoriques de l'angiogenèse, il postula immédiatement que priver la tumeur de l'acquisition de ses néo-vaisseaux la maintiendrait à l'état des tumeurs dormantes avasculaires que les chirurgiens observent fréquemment, ouvrant ainsi un nouvel axe de recherche thérapeutique.

### 1. La mise en pratique directe : bloquer l'angiogenèse

Le champ des recherches en angiogenèse a donc été orienté, depuis le milieu des années 70, vers une application dans les stratégies anti-tumorales. Et les thérapies touchant la vascularisation tumorale se sont, dans un premier temps, concentrées sur l'inhibition de la néo-angiogenèse tumorale.

### *Des avantages théoriques importants*

Un grand nombre d'arguments théoriques plaident en faveur de cette nouvelle approche thérapeutique :

- il s'agit de cibler un mécanisme considéré alors comme obligatoire au développement de toute tumeur solide, donc potentiellement indépendant du mécanisme oncogénique spécifique à la tumeur, mais n'ayant à de rares exceptions près, pas d'équivalent au niveau physiologique chez l'adulte. Le risque d'effets secondaires est donc réduit.

- Les cibles de ce traitement, les cellules endothéliales, sont particulièrement attractives : accessibles, elles sont en outre stables génétiquement donc a priori moins susceptibles d'acquérir une résistance au traitement que les cellules tumorales (**Jain et Carmeliet, 2000**).

Le décryptage progressif des voies gouvernant l'angiogenèse a dégagé un grand nombre de cibles moléculaires potentielles, à l'étude au niveau clinique (pour les drogues citées ensuite, essentiellement en phase III). Il peut s'agir :

- de bloquer, en amont, la libération du VEGF (ainsi, avec les inhibiteurs de métalloprotéases dégradant la matrice).

- d'empêcher le VEGF de se fixer à son récepteur (soit à l'aide d'anticorps, soit en utilisant des portions du récepteur au VEGF sous forme recombinante)

## Introduction : la vascularisation tumorale

---

- de bloquer la signalisation du récepteur au VEGF, soit de façon spécifique, soit dans le cadre d'inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase multi cibles
- d'empêcher l'activation des fonctions cellulaires résultant en dernier lieu de l'action des facteurs pro-angiogéniques, notamment en utilisant les facteurs anti-angiogéniques : prolifération, migration, etc.

### **Les réussites cliniques**

L'élucidation des acteurs moléculaires contrôlant l'angiogenèse a permis le développement de 8 molécules actuellement validées pour l'utilisation clinique. Elles se concentrent sur les facteurs pro-angiogéniques, et leurs récepteurs.

Avant d'aborder ces molécules représentant le cœur des thérapies anti-angiogéniques actuelles, il faut mentionner un inhibiteur qui occupe une place quelque peu à part : il s'agit de l'endostatine, le seul inhibiteur naturel de l'angiogenèse utilisé à l'heure actuelle en clinique. Isolé par l'équipe de Folkman (**O'Reilly et al., 1997**), ce fragment du collagène XVIII possède une activité anti-angiogénique, probablement liée à son interaction avec une intégrine. L'endostatine illustre remarquablement deux facettes des inhibiteurs naturels de l'angiogenèse :

- d'abord, le potentiel thérapeutique de ces molécules est élevé. Les essais réalisés chez l'animal en administrant 6 cycles successifs d'endostatine sur des tumeurs xénotransplantées, qu'on laisse croître à nouveau entre chaque administration, ne montrent aucune acquisition de résistance de la tumeur. Le contrôle réalisé avec un agent chimiothérapeutique entraîne un échappement dès le 3<sup>e</sup> cycle de thérapie. Ceci vient parfaitement démontrer la possibilité que l'endothélium, par sa stabilité génétique, représente une cible aussi stable que prévue. En outre, on observe, après un certain nombre de cycles d'endostatine, que les tumeurs deviennent dormantes et incapables de reprise de croissance. (**Kerbel, 1997** et **Boehm et al., 1997**).

- ensuite, les problèmes rencontrés dans le développement pharmacologique des inhibiteurs naturels de l'angiogenèse: la production de ces protéines sous forme recombinante est souvent difficile, et coûteuse, or les quantités nécessaires dans les tests chez les animaux sont massives et démultipliées par la nécessité de renouveler régulièrement les injections. Ces difficultés expliquent en grande partie pourquoi aucun des trente inhibiteurs naturels découverts n'a donné lieu à l'heure actuelle à une drogue utilisée en clinique. Combinées à des résultats modestes en essais cliniques, elles ont abouti à l'abandon du développement de l'endostatine en 2004. Ce n'est qu'en modifiant cette protéine pour allonger sa demi-vie et faciliter ses interactions avec le zinc que cet inhibiteur a finalement été validé, en 2005, en Chine. (**Cao, 2001**)

### **8 inhibiteurs de l'angiogenèse approuvés:**

Au premier rang des molécules anti-angiogéniques validées en clinique vient, conformément au rôle-clé dans le contrôle de l'angiogenèse prêté à sa cible, un anticorps humanisé se liant au VEGF-A, l'avastin (**Ferrara, 2002**). Trois anticorps bloquant les récepteurs aux facteurs pro-angiogéniques sont également utilisés en clinique : deux anticorps (Cetuximab, Panitumumab) bloquent le récepteur à l'EGF, le troisième (Trastuzumab) ciblant le récepteur Her-2. Enfin, 3 inhibiteurs des récepteurs tyrosine kinase possèdent une activité anti-angiogénique :

- l'erlotinib bloque spécifiquement l'activité kinase du récepteur à l'EGF
- le sorafénib et le sunitinib sont des inhibiteurs de tyrosine-kinase multi-cibles, c'est-à-dire moyennement spécifiques, ce qui leur permet d'inhiber les domaines kinases des trois

## Introduction : la vascularisation tumorale

---

récepteurs au VEGF, le récepteur au PDGF, et respectivement Raf et RET. Ces inhibiteurs à large spectre rendent difficile l'acquisition d'une résistance, mais risquent de provoquer plus d'effets secondaires liés à la multiplicité de leurs cibles. ([angio.org/patients/cancer/cancer.html](http://angio.org/patients/cancer/cancer.html), fda.org )

Deux molécules possédant une action anti-angiogénique ou anti-vasculaire constituent des cas à part dans l'histoire du développement des molécules anti-cancéreuses. La plus complexe des deux est la thalidomide. Ce dérivé synthétique de l'acide glutamique a été prescrit aux femmes enceintes à compter du milieu des années 50 en tant que sédatif et antiémétique. Mais en 1961, il est retiré du marché lorsque l'on constate qu'il possède de puissants effets tératogènes (ces déformations vont toucher de 8000 à 12000 nouveau-nés). Il est à nouveau utilisé, sous un contrôle strict, en tant qu'immunosuppresseur, à compter de 1965, mais ce n'est qu'en 1991 qu'une base mécanistique sera proposée, l'inhibition du relargage du TNF- $\alpha$  par les monocytes. En 1994, l'équipe de Folkman montre que la molécule possède en outre une action anti-angiogénique (**D'Amato et al., 1994**). La synthèse d'analogues de la thalidomide aux effets secondaires réduits au milieu des années 1990 (initialement afin d'en exploiter les propriétés anti-angiogéniques) a permis d'envisager que cette molécule puisse servir d'agent anticancéreux, de par ses propriétés anti-angiogéniques, mais aussi anti-inflammatoire. Cette stratégie aboutit, en février 2003, à une validation accélérée de la thalidomide dans le traitement des myélomes multiples, une pathologie cancéreuse caractérisée par la prolifération de cellules B dans la moelle osseuse et présentant une angiogenèse accrue, par le FDA. Ainsi est validée une molécule dont le mécanisme d'action est mal connu et complexe, mais qui possède incontestablement une composante touchant les vaisseaux. (Résumé par **Bartlett et al., 2004**).

Le bortezomib est un inhibiteur de la sous-unité 26S du protéasome, impliquée dans la destruction ciblée des protéines ubiquitinylées. In vitro, cette molécule déclenche l'apoptose massive des cellules myélomateuses, une action que l'on pense liée à une stabilisation de l'inhibiteur de NF- $\kappa$ B... cette action a conduit à sa validation par la FDA en 2003, en tant qu'agent simple de troisième ligne contre le myélome multiple. La même année, il est publié que la molécule pourrait posséder une action anti-vasculaire ou angiogénique, car elle empêche la vascularisation d'une lignée de cancer de la prostate très vascularisée (**Williams et al., 2003**), des résultats confirmés in vitro : le bortezomib bloque des fonctions caractéristiques de l'angiogenèse comme la migration ou la sécrétion de VEGF. Bien qu'obtenus à partir de patients souffrant de myélofibrose, une autre affection de la moelle osseuse, des résultats récents démontrent l'action anti-angiogénique du bortezomib sur des explants tumoraux.

Ainsi, on retrouve tous les niveaux de spécificité au sein des quelques molécules anti-angiogéniques validées, depuis des molécules dédiées spécifiquement à une voie pro-angiogénique, à des molécules dont l'action anti-angiogénique semble incidente, en passant par des molécules de spécificité moyenne comme les inhibiteurs de tyrosine-kinase.

***Les limites : la remise en cause des avantages théoriques, un développement rapide au détriment de la compréhension fine des mécanismes***

### **Un nombre limité de validations cliniques :**

Il peu paraître surprenant que, face au nombre élevé de cibles potentielles, moins d'une dizaine de molécules soit utilisée en clinique. Le développement des anti-angiogéniques s'est heurté à un certain nombre d'obstacles spécifiques relativement sous-estimés au début des années 80 :

En premier lieu, les tests utilisés dans le criblage des drogues anti-cancéreuses classiques se sont avérés particulièrement peu adaptés aux anti-angiogéniques, et de façon plus générale à tout

## Introduction : la vascularisation tumorale

---

traitement impliquant le microenvironnement : il n'est évidemment pas possible d'utiliser les tests in vitro, c'est à dire sur des lignées tumorales seules, et les biais des modèles de tumeurs xénotransplantées, déjà évoqués, deviennent ici de réelles limites :

- d'abord, les tumeurs sont souvent implantées en sous-cutané, qui ne peut simuler correctement les propriétés du microenvironnement dans lequel la tumeur se développe normalement. Or, comme expliqué dans la partie « angiogenèse tumorale », les propriétés locales conditionnent étroitement le mode de développement de la vascularisation tumorale, et, partant, les propriétés de celle-ci.

- ensuite, les tumeurs transplantées ont souvent des profils de croissance extrêmement élevés, ce qui conduit à un développement également rapide de leur vascularisation, produisant des biais tant du point de vue du recrutement des progéniteurs que du nombre de cellules proliférantes au sein des vaisseaux néoformés, autant de paramètres modifiant considérablement la réponse aux drogues.

- cependant, et même si ce concept a été développé spécifiquement pour les inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse, il est important de noter que les critères de régression massive des tumeurs, indispensables pour une validation d'un agent chimiothérapeutique, pourraient s'avérer peu adaptés dans le cas des anti-angiogéniques, qui sont censés entraîner moins de toxicité et moins d'apparition de résistance : ces molécules devraient, a priori, pouvoir se contenter d'un contrôle tumoral, c'est-à-dire d'un effet cytostatique.

Outre les obstacles survenant au cours du développement des anti-angiogéniques, leur usage conduit à réévaluer les avantages théoriques qu'ils semblaient posséder initialement, c'est-à-dire l'absence de toxicité et d'apparition de résistances en cours de traitements.

### Des cas de toxicité :

En ce qui concerne la toxicité, l'utilisation du bevacizumab et des inhibiteurs de tyrosine-kinase s'est accompagnée d'un certain nombre d'effets secondaires sévères, à court terme. Ainsi, la FDA a intégré à ses recommandations d'utilisation du bevacizumab (**Verheul et Pinedo, 2007**) les risques de complication dans la cicatrisation, de perforations intestinales (pour les cancers colorectaux) et d'hémorragies (pour les cancers du poumon non à petites cellules). On ne dispose pas du recul nécessaire pour savoir si ces traitements s'accompagnent en plus d'effets à long terme, mais les modèles murins montrent qu'une inhibition à long terme du VEGF peut conduire à une dégénérescence des neurones moteurs (**Carmeliet et Jain, 2000**). Trois types de toxicité sont à craindre :

- les inhibiteurs de tyrosine kinase ont un spectre d'action large et donc peuvent atteindre des fonctions bien au-delà de l'angiogenèse, un problème compliqué lorsque des voies multiples sont touchées par la combinaison avec un traitement de type chimiothérapie.

- le rôle du VEGF, et des autres facteurs de croissance, paraît de plus en plus large, avec notamment un impact systémique (fonction rénale, régulation de la pression artérielle, système de la coagulation) faisant craindre des effets croisés insoupçonnés, en plus d'expliquer ceux déjà découverts.

- le fait que l'endothélium quiescent et mature soit totalement indépendant des facteurs de croissance, un argument moléculaire qui justifiait souvent le peu de toxicité attribuée aux traitements anti-angiogéniques, pourrait être revu.

Le problème de la toxicité est d'autant plus aigu, que l'on ne dispose pour l'instant que de peu de marqueurs de l'efficacité des traitements anti-angiogéniques in vivo, ce qui conduit à augmenter les doses administrées (**Kamb et al., 2007**).

# Introduction : la vascularisation tumorale

---

2. Des stratégies en cours de développement, visant la vascularisation tumorale établie :

Catégorie d'agents connexes aux anti-angiogéniques, les anti-vasculaires constituent une classe de molécules destinée à agir spécifiquement et directement sur la vascularisation établie, mais encore au stade du développement préclinique.

## ***Les vasculotoxiques (Vascular Disruptive Agents)***

Les agents ciblant la vascularisation peuvent être divisés en deux groupes.

Le premier rassemble des molécules de petite taille qui exploitent des spécificités physiopathologiques de l'endothélium tumoral pour produire une occlusion de ces vaisseaux (**Thorpe, 2004**), et a atteint le stade des essais cliniques.

Elle comprend deux familles de molécules :

- des agents déstabilisant les microtubules : les molécules de base dans ce domaine, colchicine et alcaloïdes Vinca, ne montrent un effet anti-vasculaire qu'à des concentrations frôlant la toxicité.

Les combrestatines (CA-4, CA-1-P, ...) sont des molécules apparentées à la colchicine, mais dont l'action anti-tumorale est possible dès les basses doses.

- Les flavonoïdes (essentiellement le DMXAA) sont dérivés de l'acide acétique flavone, à forte activité anti-tumorale passant notamment par une hémorragie tumorale, mais toxique.

Ces molécules provoquent, une fois administrés dans des modèles animaux, une chute rapide (intervenant durant la première demi-heure) du flux sanguin alimentant la tumeur. La privation d'oxygène et de nutriments aboutirait à la destruction des cellules tumorales par nécrose. Ce sont ces résultats qui ont fondé les essais cliniques, tant pour le CA-4-P (phase II complétée) que le DMXAA (phase I en cours).

La question du ciblage spécifique de la vascularisation tumorale par ces agents est, de façon surprenante, assez mal élucidée, et pourraient provenir tant de spécificités des cellules endothéliales tumorales (structurales, par exemple au niveau du cytosquelette, comme fonctionnelles, comme le taux de prolifération), que d'un co-signal fourni par le microenvironnement.

Le second groupe, qui a seulement atteint le stade préclinique mais a fait l'objet d'intenses efforts de recherche, est constitué de molécules ciblant spécifiquement l'endothélium. Une étude induisant l'expression de molécules du CMH II sur des cellules endothéliales tumorales, puis induisant la régression tumorale au moyen d'un anticorps contre le CMH II couplé à une toxine, a montré la faisabilité de telles approches (**Burrows *et al.*, 1993** et **Burrows et Thorpe, 1993**). Un grand nombre de systèmes ont depuis été testés, combinant :

- une molécule de ciblage, comme un anticorps ou un peptide, visant des marqueurs caractéristiques de processus angiogéniques, d'adhérence cellulaire, pro-thrombotiques ou un facteur de croissance
- une molécule active, soit toxique (toxine, ligand radioactif), soit pro-thrombotique (essentiellement le Tissue Factor), soit stimulant le système immunitaire (cytokines).

## Introduction : la vascularisation tumorale

---

Ces approches ont été renforcées par l'utilisation de technologies dédiées à la mise en évidence de nouveaux antigènes, comme le phage-display (**Pasqualini et Ruoshlanti, 1996**) ou par fractionnement subcellulaire de tissu (**Oh et al., 2004**).

Enfin, des systèmes visant à introduire des gènes toxiques ou renforçant la réponse immunitaire ont été élaborés, en utilisant des lipides cationiques ou des vecteurs rétroviraux (**Thorpe, 2004**).

### 3. Quelles sont les fonctions mises en jeu ?

Le principe qui a guidé les stratégies anti-angiogéniques était qu'une tumeur ne pouvant développer sa vascularisation serait, faute d'oxygène et de nutriments, sévèrement contrariée dans son développement, voire dans sa survie même.

Mais comprendre les mécanismes d'action réels des anti-angiogéniques est compliqué : concept puissant, mais sans concurrence au début des années 80, le blocage de la néo-angiogenèse a été utilisé comme qualificatif par défaut pour toute stratégie touchant à la vascularisation tumorale, y compris pour des molécules dont la valeur thérapeutique a poussé au lancement d'essais cliniques sans pour autant que leur mécanisme d'action soit bien compris. Que sait-on des mécanismes d'action réels de ces thérapies ?

La première notion critique pour comprendre le mode d'action des thérapies touchant le réseau vasculaire, est celle de la superposition des fonctions contrôlées par les facteurs pro-angiogéniques. Ceux-ci sont en général des molécules contrôlant un large nombre de fonctions, non seulement celles décrites classiquement dans l'angiogenèse (migration, prolifération, etc.), mais également d'importantes voies de survie. L'inhibition des facteurs pro-angiogéniques, directe ou en aval de leurs récepteurs par les TKI, amoindrit les voies de survie des cellules endothéliales. La frontière entre effet anti-angiogénique et anti-vasculaire est donc mince.

La mort de l'endothélium est également présente dans les autres stratégies présentées auparavant. Ainsi, l'application répétée d'agents chimiothérapeutiques classiques à des faibles doses produit un puissant effet anti-angiogénique ce qui permet, dans des modèles de xénogreffes au moins, de s'affranchir des résistances tumorales apparaissant classiquement en cours de traitement (**Browder et al., 2000** et **Klement et al., 2000**).

En ce qui concerne les vasculotoxiques, leur mode d'action principal est basé, pour les molécules de petite taille, sur des variations brutales de la perméabilité vasculaire, un effet souvent associé au niveau moléculaire à des régulations de la protéine Rho. Mais cette régulation n'est pas unique : pour les flavonoïdes, elle s'accompagne d'une induction de l'apoptose des cellules endothéliales, tandis que les combréstatines semblent exercer une toxicité de type métronomique envers ce même endothélium.

On retrouve ces effets anti-vasculaires dans l'action de la thalidomide comme du bortezomib. Mais à nouveau, la superposition des actions anti-angiogéniques et vasculaires semble ici de mise : Dans le cas du thalidomide, plusieurs hypothèses subsistent encore au niveau moléculaire pour expliquer l'action anti-angiogénique de la molécule, comme sa capacité à s'intercaler dans les promoteurs des gènes codant pour l'IGF-1, ou les sous-unités  $\alpha V$  ou  $\beta 3$  des intégrines (**Stephens et al., 2000**), ou en générant des espèces activées de l'oxygène, qui semblent capables d'activer les voies de mort (**Knobloch et Rütther, 2008**). On retrouve également l'ambiguïté entre action anti-angiogénique et action anti-vasculaire : certains résultats plaident pour la première, comme la capacité à bloquer des essais standards d'angiogenèse induits par le bFGF (**D'Amato et al., 1994**) ou sur des explants d'aorte

## Introduction : la vascularisation tumorale

---

(**Dredge et al., 2002**), et ce de façon réversible, ce qui est en phase avec leur capacité à inhiber la prolifération des cellules endothéliales sans affecter leur viabilité pour autant (**Moreira et al., 1999**). Mais en parallèle, d'autres résultats tendent vers l'existence d'une composante anti-vasculaire : induction d'une mort de la vascularisation dans un système de xénogreffe de neuroblastoderme (**Kaicker et al., 2003**), ou atteintes à la vasa vasorum (**Kirchmair et al., 2007**). Et le mécanisme d'action est d'autant moins clair que de multiples cibles du système immunitaire semblent modulées par la molécule.

On retrouve ce recouvrement entre action anti-angiogénique et anti-vasculaire, dans les études réalisées pour cerner le mode d'action du bortezomib : les études, réalisées avec divers modèles de xénogreffes, montrent une baisse de la densité des microvaisseaux, ainsi qu'une inhibition de la sécrétion de VEGF (**Sunwoo et al., 2001, Williams et al., 2001**, par exemple) mais révèlent une action tant anti-angiogénique typique (**Roccaro et al., 2006**) qu'une action anti-vasculaire (**Nawrocki et al., 2004**).

La compréhension des mécanismes est d'autant moins aisée que ces molécules, à la différence des agents anti-angiogéniques qui sont le produit d'une approche allant de la fonction vers l'inhibiteur, ont été validées pour leurs effets globaux, avant qu'on tente d'en décrypter les effets moléculaires. Même s'ils étaient bien délimités à l'échelle cellulaire, les effets des anti-angiogéniques sont souvent complexifiés par leur association au traitement de référence :

Si l'on se focalise, par exemple, sur le bevacizumab, l'anticorps anti-VEGF, qui constitue l'archétype des traitements ciblant les voies pro-angiogéniques : en 1998, cinq essais de phase II utilisant le bevacizumab sont lancés, 3 en tant que simple agents, deux combinés avec la chimiothérapie standard. Seules ces deux dernières applications ont finalement fait l'objet d'une validation par la FDA (**Ferrara, 2002**). De même, les traitements bloquant les récepteurs à l'EGF et HER2 sont en priorité, combinés à une chimiothérapie.

L'association entre traitement de première ligne et agent anti-angiogénique s'explique en partie par des nécessités éthiques qui conditionnent les essais thérapeutiques, mais recouvre peut être une synergie mécanistique, les stratégies anti-angiogéniques abaissant les niveaux de protection des cellules endothéliales, qui peuvent du coup s'avérer plus vulnérables aux traitements cytotoxiques.

Ainsi, la mort de l'endothélium est un thème commun à l'ensemble des thérapies affectant la vascularisation tumorale, même si ce terme pourrait recouvrir des modalités particulières suivant les traitements, et qu'il est parfois difficile de décrypter les mécanismes réels à l'origine de l'action d'une drogue, en raison de la multiplicité tant des effets que des combinaisons de traitements.

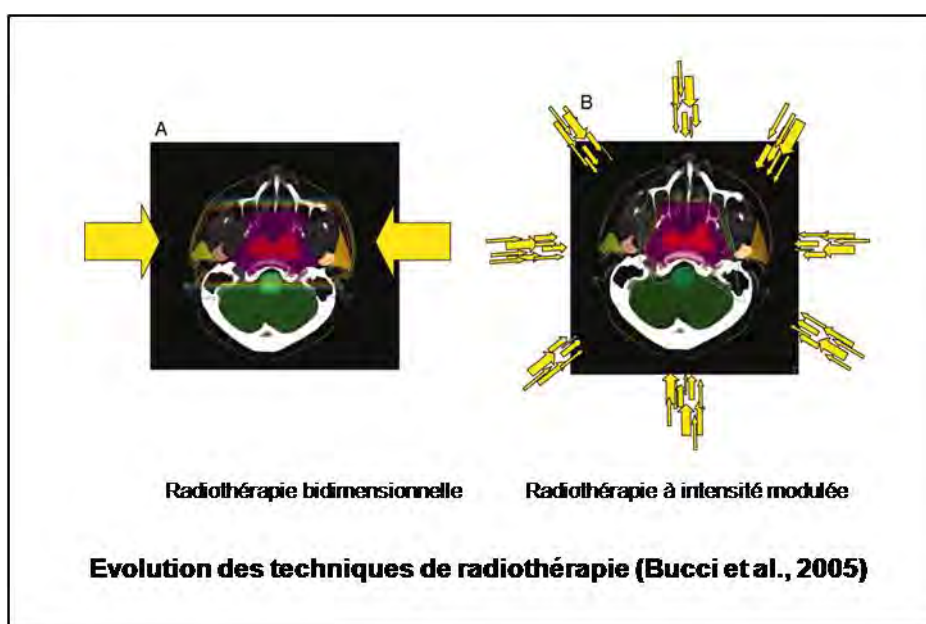
### III. La destruction de la vascularisation par l'irradiation unique à forte dose

#### 1) La réémergence de l'hypofractionnement

##### 1. Première dynamique: l'évolution interne à la RT fractionnée

La radiothérapie fractionnée a connu des évolutions majeures depuis les années 50 : dans les années 60, les accélérateurs linéaires deviennent les supports de base de la radiothérapie, utilisés dans un premier temps dans des dispositifs qualifiés de « radiothérapie bidimensionnelle », où un seul rayon est utilisé selon 1 ou 4 directions. Le volume irradié reste donc assez peu modulable: moins on peut ajuster ce dernier, plus les doses reçues par les tissus sains sont importantes, et plus on doit se cantonner à des doses faibles (hyperfractionnées).

Le champ va être marqué à partir des années 70 par la coévolution entre techniques d'imagerie et dispositifs d'irradiation. A cette époque, en effet, la découverte de l'imagerie par tomographie permet d'obtenir des représentations tridimensionnelles des tumeurs et des organes environnants. La radiothérapie conformationnelle consiste à utiliser des faisceaux d'irradiation multiples pour tenter de suivre au plus près la forme de la tumeur, et est devenue le standard clinique à la fin des années 80. Avec l'apparition de systèmes d'imagerie fonctionnelle comme le PET-scan (qui permet de repérer les tumeurs grâce à un traceur radioactif de leur métabolisme), la résolution avec laquelle on peut représenter les tumeurs augmente. Les systèmes d'imagerie contrôlent l'élaboration des plans d'irradiation (c'est ce qu'on appelle la « planification inverse »), qui sont réalisés ensuite par de multiples faisceaux d'irradiation, l'intensité de chacun étant fractionnable et modulable, grâce à des collimateurs multilames. On limite ainsi la dose à la peau et sur le trajet de chaque faisceau individuel à travers les tissus sains. On parle alors de radiothérapie à intensité modulée.





# Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

De façon intéressante, l'amélioration de la « sculpture » de la tumeur par les rayons permet d'augmenter les doses délivrées... (IMRT-Collaborating Working Group, 2001 et Bucci *et al.*, 2005)

## 2. Seconde dynamique : le retour de l'hypofractionnement

En parallèle à cette évolution de la radiothérapie conventionnelle permettant de délivrer des doses croissantes d'irradiation, les techniques de radiothérapie hypofractionnées, abandonnées en pratique dans les années 30, vont émerger à nouveau durant les années 50, à travers deux approches : la stéréotaxie, et la radiothérapie intra-opérative.

Cette dernière consiste à soumettre une zone à l'irradiation dans la continuité d'une opération, souvent une exérèse. En écartant les structures saines de la zone tumorale ou en les recouvrant individuellement avec des protections métalliques, on peut diminuer la dose qu'elles reçoivent (Timmerman, 2008).

La stéréotaxie est un dispositif mis au point par Lars Leksell dans les années 50, et permettant de faire converger des faisceaux multiples de rayons X sur une zone précise où la dose atteinte est très élevée. Développée initialement afin de pallier à l'inaccessibilité de certaines zones cérébrales à la chirurgie, par exemple pour des thalatomies, elle est ensuite appliquée aux tumeurs cérébrales à partir des années 70, bénignes (hémangiomes, etc.) puis sévères, puis enfin aux tumeurs extra-cérébrales à partir de 1995 (les doses testées s'échelonnent de 6/8 Gy à 30 Gy, avec 20 Gy pour les cancers pulmonaires, les métastases hépatiques et médullaires) (Nedzi, 2008). En France, cette stratégie est validée pour le traitement des métastases crâniennes, avec des doses supérieures à 20 Gy au cœur de la tumeur.

Ainsi, l'évolution des pratiques cliniques rend possible l'utilisation de doses exclues du champ des investigations de la radiobiologie classique, car considérées comme inapplicables à la thérapie.

La conséquence directe de cette domination de la radiothérapie fractionnée est le manque de modèles fondamentaux sur lesquels baser l'effet des radiations fortes doses, les deux hypothèses possibles, et non exclusives, étant que les irradiations fortes doses constituent le prolongement des basses doses, ou qu'elles engagent des cibles spécifiques au-delà d'un seuil donné.

## 3. Les modèles animaux et l'implication de la vascularisation dans la réponse à l'irradiation forte dose

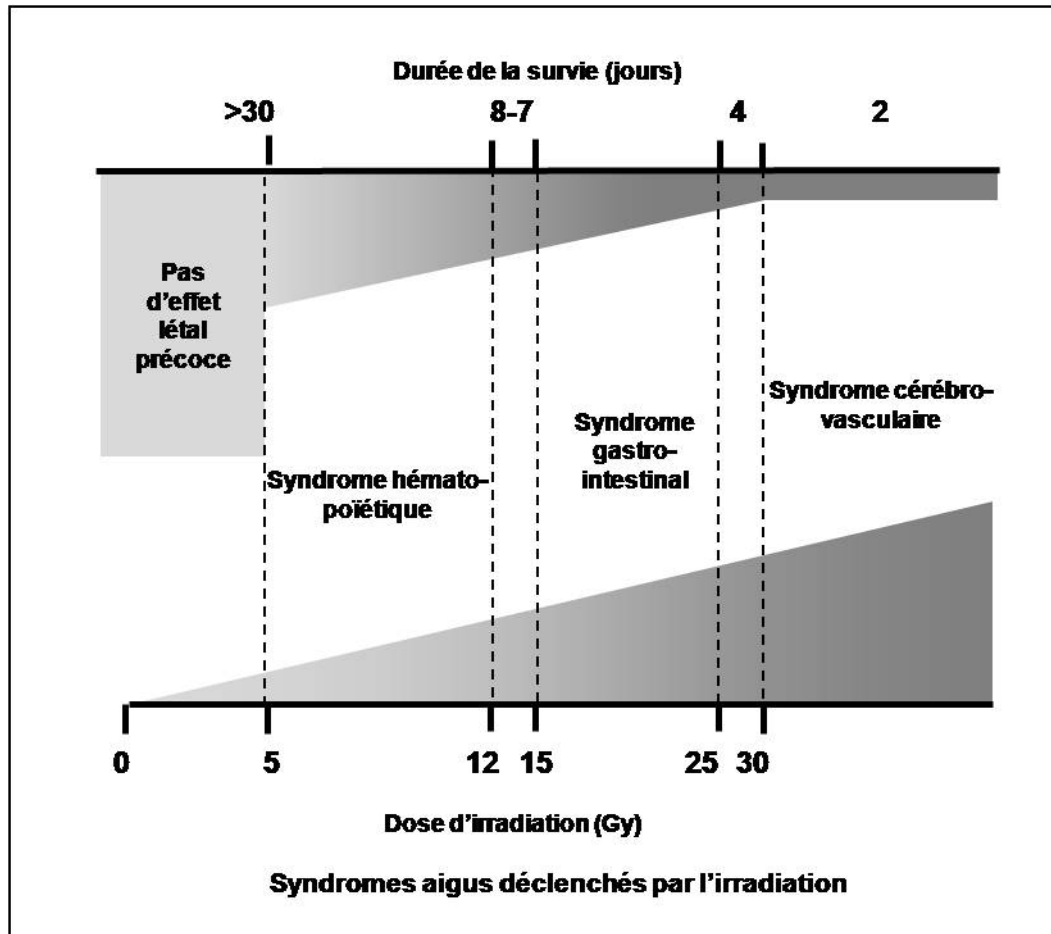
### ***Les syndromes entraînés par l'irradiation à forte dose :***

Ce sont des modèles animaux que vont émerger les nouveaux concepts susceptibles d'éclairer l'effet des radiations fortes doses, tout comme précédemment ils avaient fourni le cadre théorique supportant le recours au fractionnement de dose.

Les irradiations accidentelles du corps entier, à forte dose, se traduisent, chez l'homme, par l'apparition rapide de syndromes létaux, qualifiés d'« effets létaux précoces ». L'organe défaillant, et la cinétique de déclenchement du syndrome, sont conditionnés par la dose reçue. Le syndrome hématopoïétique est la cause de la mort, survenant entre 30 et 60 jours, des personnes exposées de 3 à 8 Gy. De 5 à 12 Gy, un syndrome gastro-intestinal, caractérisé par des diarrhées hémorragiques, intervient entre 5 et 10 jours. Enfin, aux plus fortes doses (100 Gy), un syndrome cérébro-vasculaire

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

se déclenche sous 48h. Le nombre de cas cliniques correspondant à chaque syndrome est extrêmement limité, empêchant une description détaillée de chacun.



On retrouve la hiérarchie des effets létaux précoces chez les souris, quoique avec des doses et des cinétiques sensiblement modifiées. De 8 à 13 Gy, les animaux meurent tous entre 10 et 13 jours du syndrome hématopoïétique. A partir de 15 Gy, c'est le syndrome gastro-intestinal qui est la cause de la mort des animaux entre 6 et 8 jours. A 14 Gy, les deux syndromes interviennent, avec 75% de syndrome gastro-intestinal et 25% de syndrome hématopoïétique (Paris *et al.*, Science, 2001).

### *L'explication classique par la mort clonogénique*

Quelles sont les bases biologiques de ces phénomènes ? Le syndrome cérébro-vasculaire est le moins bien compris, on soupçonne l'implication d'une altération de la perméabilité vasculaire dont les conséquences seraient une augmentation de la pression intracérébrale, mais sans que l'on connaisse le mécanisme détaillé. D'autant que lorsqu'on limite l'irradiation uniquement à la zone cérébrale, des doses supérieures sont nécessaires pour que le syndrome apparaisse.

En ce qui concerne les modèles expliquant les syndromes hématopoïétiques et gastro-intestinaux, ils se sont initialement appuyés sur le concept de mort clonogénique, développé principalement, comme décrit précédemment, pour expliquer les effets anti-tumoraux des radiations ionisantes. Dans les deux cas, il était postulé que l'irradiation déclenchait la mort post-mitotique des compartiments clonogéniques. Ceci aboutissait progressivement à une déplétion des cellules différenciées

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

alimentées par ces cellules clonogéniques, que ce soit les cellules sanguines dans le cas des précurseurs situés dans la moelle osseuse, ou les cellules épithéliales pour les précurseurs situés en position 4 à 6 au fond des cryptes intestinales. Cette théorie semblait étayée par le fait que la moelle osseuse comme les cryptes intestinales soient deux compartiments fortement proliférants.

### *Exploration par les souris KO et retour de l'apoptose*

Le développement de l'invalidation génétique dans les souris a permis d'envisager une étude plus approfondie des mécanismes gouvernant ces syndromes.

Ainsi, il est apparu que le concept de mort clonogénique seul était insuffisant pour expliquer le syndrome hématopoïétique. En effet, lorsque p53 est inactivé, on préserve à la fois les progéniteurs hématopoïétiques, mais également les thymocytes. La notion d'apoptose p53-dépendante intervient donc en plus du concept de mort clonogénique.

Rappelons brièvement que la mort cellulaire programmée ou régulée (souvent désignée par le terme décrivant ses conséquences morphologiques, apoptose) désigne une séquence d'évènements moléculaires par laquelle une cellule, en général sous l'effet de signaux extérieurs (des ligands par exemple) ou intrinsèques (dommages à l'ADN, altération de l'intégrité du réticulum endoplasmique, etc.), est conduite à la destruction (**Ameisen, 2002**).

Le cœur de la cascade gouvernant la mort cellulaire programmée a été identifié en premier lieu chez *C.elegans*, dont on peut suivre le devenir de l'ensemble des lignages cellulaires. Il permet de comprendre les principes de base gouvernant ce mécanisme : une protéase (Ced-3) est responsable de la destruction de la cellule en clivant de multiples substrats. Mais elle n'est activée que si elle s'oligomérisse, sous l'effet d'une protéine adaptatrice (Ced-4). Ce binôme est lui-même maintenu à l'état inactif par la protéine anti-apoptotique (Ced-9). La mort cellulaire programmée est déclenchée dans les cellules de *C.elegans* quand les informations spécifiques à chaque lignée de cellules conduisent à l'expression d'une protéine (Egl-1) qui lève l'inhibition de Ced-9, laissant le binôme Ced-4/3 conduire à la destruction de la cellule. Les grands principes qui se dégagent dans le mécanisme de cet organisme-modèle sont que les éléments de base entraînant la mort cellulaire programmée sont tous présents dans chaque cellule mais maintiennent inactif l'effecteur, la protéase.

Durant les années 90, les travaux sur les organismes modèles comprenant les éponges, l'hydre, la mouche, le poisson-zèbre, et la souris, tout comme ceux sur l'homme, ont révélé la présence surprenante des gènes identifiés initialement chez *C.elegans*, même si chez l'homme, les 4 acteurs de base se sont multipliés en de nombreux gènes.

On retrouve donc des protéases dont l'activation, qui conduit à la destruction de la cellule, est sous le contrôle de gènes homologues au module Ced-9 /Egl-1. Ces caspases (cysteinyl-aspartate-cleaving proteases), les 3, 6 et 7, prennent en charge la phase d'exécution de l'apoptose, clivant un grand nombre de cibles et entraînant l'apparition d'un certain nombre de caractéristiques des cellules apoptotiques (fragmentation de l'ADN en « échelle », externalisation de la phosphatidylsérine sur le feuillet externe de la membrane, perte d'adhérence des cellules et formation de corps apoptotiques). Mais le système d'activation des caspases est complexifié, puisque le contrôle des homologues de Ced-3/4, désignées sous le nom de famille Bcl-2, ne s'exerce pas directement sur les caspases : la régulation s'effectue au niveau de la mitochondrie. Lorsque celle-ci est perméabilisée, elle libère le cytochrome C qui se fixe à l'équivalent de Ced-4, Apaf-1, formant un complexe qui active la caspase 9 (c'est cette caspase qui va activer ensuite les caspases effectrices). La famille Bcl-2 se subdivise entre des membres homologues à Ced-9, dits « à multi-domaines », qui antagonisent les membres pro-apoptotiques en s'y associant, notamment Bax et Bak. Ce sont ces derniers qui provoquent la

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

libération des facteurs stockés dans l'espace intermembranaire mitochondrial. La régulation de Bax et Bak s'effectue de différentes manières, soit par régulation de leur transcription comme via p53, soit par action des homologues d'Egl-1, que sont Bid ou Bim, qui délogent Bax et Bak des hétérodimères avec les protéines à multi-domaines. Une voie alternative à cette voie intrinsèque et mitochondriale couple directement certains récepteurs (comme Fas ou le TNFR) à des caspases initiatrices, comme la caspase 8, capable d'activer les caspases effectrices : c'est la voie extrinsèque, qui peut en outre se coupler à la voie intrinsèque lorsque la caspase 8 clive Bid.

On aboutit donc à un système complexe, présentant par ses multiples voies une grande robustesse, mais qui est également bien plus complexe dans ses modalités d'action précises que le système de base de *C.elegans*, car on constate que des voies spécifiques à chaque type cellulaire pourraient exister (**Cory et Adams, 2002**).

### ***Le cas du syndrome gastro-intestinal : l'implication de l'endothélium microvasculaire***

De même, les mécanismes gouvernant le syndrome gastro-intestinal ont été explorés en utilisant le modèle murin. Des études histologiques détaillées de Potten ont précisé les événements affectant la crypte intestinale suite à l'irradiation (**Potten, 1990**).

En situation physiologique, la villosité est constituée majoritairement de cellules épithéliales qui migrent vers l'apex et y sont éliminées. Ces cellules sont alimentées par un compartiment représentant les cellules en position 7-12 dans la crypte (c'est-à-dire la base des villosités), en division rapide. Ces cellules sont elles-mêmes régénérées par les divisions plus lentes des cellules en position 4 à 6, historiquement considérées comme les cellules souches de l'intestin. Des travaux récents montrent que des cellules intercalées entre les cellules de Paneth, qui forment la base des cryptes, seraient en fait les véritables cellules souches des cryptes, alimentant les cellules en position 4-6 (**Barker et al., 2007**).

### **Le modèle du syndrome gastro-intestinal élaboré par le groupe Potten:**

L'irradiation, même à faible dose, s'accompagne de l'apparition rapide (dès 2h, avec un pic à 4h), d'une vague d'apoptose dans les cellules en position 4-6, les cellules restantes étant majoritairement bloquées en cycle (en phase G2).

Initialement, Potten a postulé que c'est cette vague de mort rapide, conjuguée au blocage en cycle et au maintien de la migration des cellules vers l'apex, qui aboutissait en 48h à un rétrécissement spectaculaire de la taille des villosités. S'il perdure, il conduit à une mort de l'animal par déshydratation et infection en 6 à 8 jours.

Mais la vague de mort initiale, survenant en 4h, ne semble pas gouverner le syndrome gastro-intestinal : d'abord, elle se déclenche dès les très faibles doses, atteignant son maximum dès 1 Gy. Ensuite, les souris invalidées pour p53 ne présentent ni vague de mort, ni blocage en G2, mais ne sont pas pour autant protégées du syndrome, qui survient même pour des doses plus faibles (**Komarova et al., Oncogene, 2004**). Il semble donc que ce soit une vague de mort plus tardive, intervenant vers 24h, et correspondant à une mort clonogénique, qui soit en fait responsable de l'atteinte aux cryptes (**Merritt et al., 1997**). Si les cellules progénitrices sont trop sévèrement atteintes, elles ne peuvent repeupler la crypte après 72h.

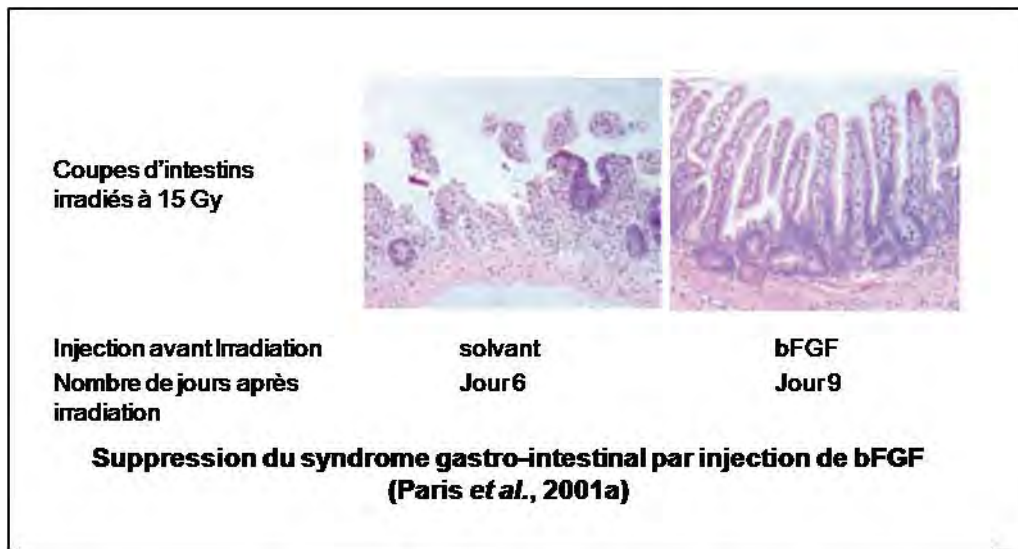
Mais, comme le remarquait Potten dans sa synthèse sur le syndrome gastro-intestinal : « il ne faut pas oublier que l'intestin est un organe complexe, comprenant de nombreux tissus et types

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

cellulaires interagissant les uns avec les autres ». S'il laisse ouverte la possibilité d'une intervention d'autres types cellulaires dans le syndrome gastro-intestinal, Potten écarte cependant toute intervention de l'endothélium vasculaire dans la réponse à l'irradiation, essentiellement parce que selon lui, les altérations détectées jusqu'alors dans l'endothélium sont très tardives. (Potten, 1990).

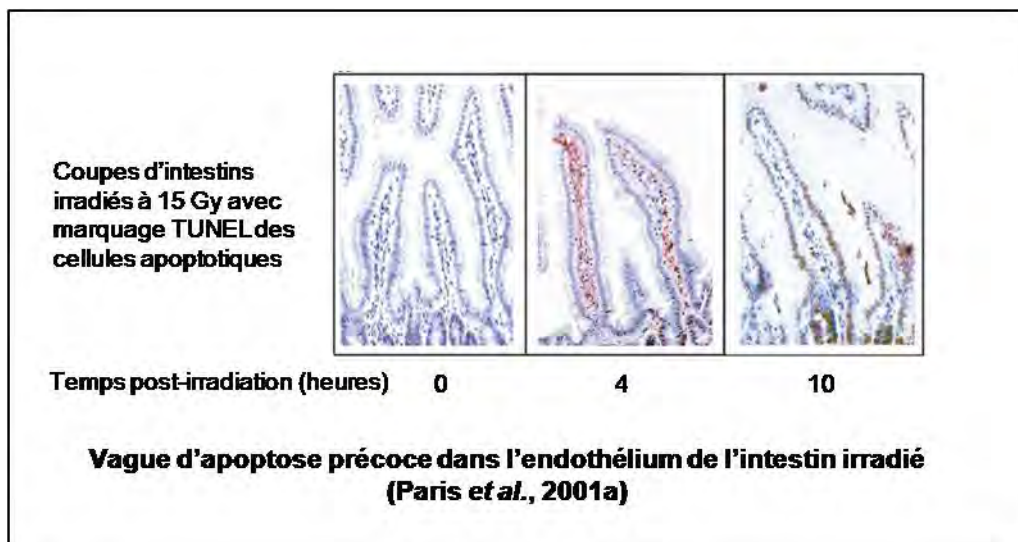
### La réévaluation du modèle par le groupe Kolesnick :

La place de l'endothélium va pourtant être réévaluée lorsque l'on découvre que l'injection de bFGF permet d'inhiber le syndrome gastro-intestinal (Paris *et al.*, 2001).



Ce résultat est paradoxal, car le bFGF, puissant pro-angiogénique, ne possède de récepteurs dans l'intestin que sur l'endothélium (et les cellules de Paneth).

Parallèlement, une vague d'apoptose précoce est mise en évidence dans les cellules endothéliales.

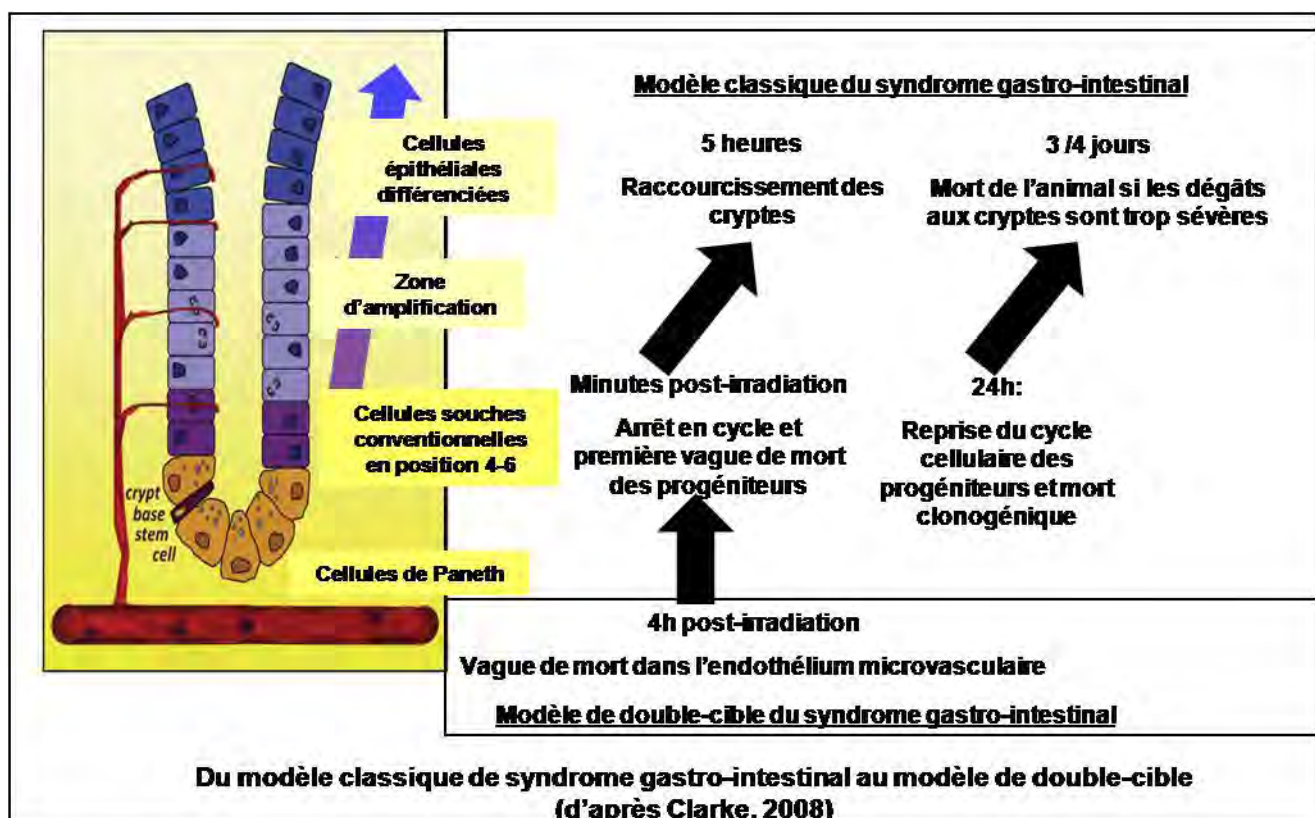


Or, le bFGF s'avère justement capable de supprimer cette vague d'apoptose endothéliale.

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

Il semble donc possible, en protégeant l'endothélium vasculaire, de bloquer la destruction des cryptes intestinales, et, partant, le syndrome gastro-intestinal. Ces résultats introduisent donc un nouveau modèle d'explication du syndrome, reposant sur une réorganisation des cibles cellulaires lorsque l'irradiation dépasse un seuil suffisant d'irradiation : au-delà de 15 Gy, c'est l'intervention d'une composante vasculaire qui déterminerait l'irréversibilité des dommages du compartiment clonogénique (Paris *et al.*, 2000a et Maj *et al.*, 2003).

Ils constituent l'aboutissement d'une ligne de recherche étudiant la réponse des cellules endothéliales à l'irradiation forte dose, menée par l'équipe de R. Kolesnick. En 1994 sont publiés les premiers résultats montrant l'existence d'une mort « interphasique », non clonogénique, dans les cellules endothéliales en culture, après irradiation (Haimovitz-Friedman *et al.*, 1994). Cette apoptose est bloquée si l'on expose les cellules au bFGF. Or, le bFGF ne modifie en rien le taux de dommages à l'ADN induits par les rayonnements ionisants, pas plus qu'il n'accélère leur réparation. Le mécanisme de la mort des cellules endothéliales semble donc indépendant d'une voie déclenchée par les dommages à l'ADN, que ceux-ci résultent en une mort post-mitotique, ou en une apoptose directe. Ces résultats ont été validés *in vivo* en utilisant un modèle de pneumonie induite par l'irradiation thoracique à forte dose (22.5 Gy). Les souris développent, sous un mois, une pneumonie fatale dans 60% des cas. On retrouve une mort rapide de l'endothélium qui, lorsqu'elle est abolie par l'injection de bFGF, permet de réduire de moitié la mort des animaux (Fuks *et al.*, 1994).



Une composante d'apoptose vasculaire sera également mise en évidence dans le système nerveux central exposé à une très forte dose d'irradiation, et à nouveau bloquée par le bFGF (Pena *et al.*, 2000).

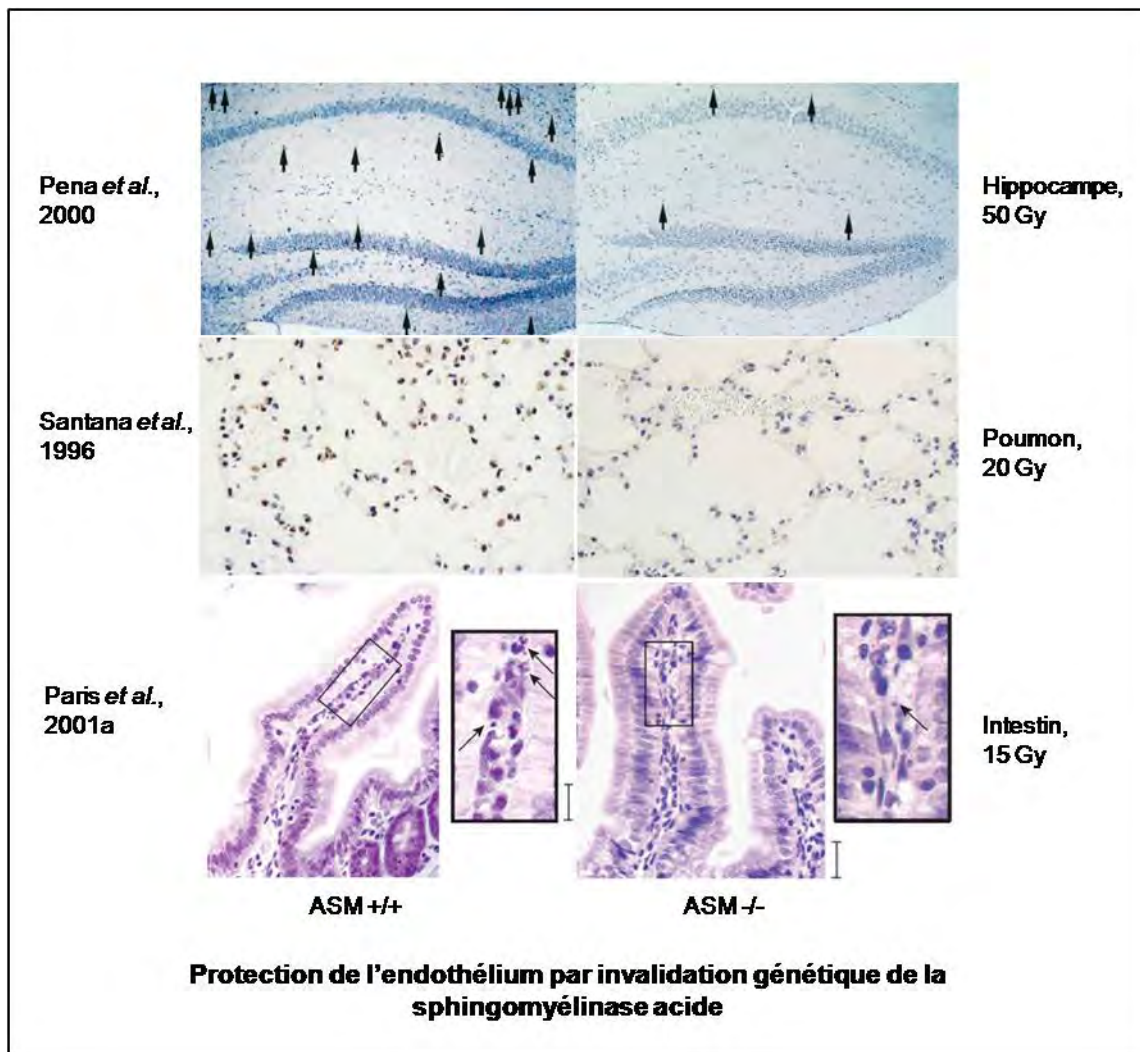
De multiples systèmes démontrent donc l'existence d'une vague d'apoptose rapide frappant les cellules endothéliales après une irradiation unique à forte dose. En inhibant cette apoptose, par l'injection de bFGF, on peut, au moins dans les modèles de pneumonie et de syndrome gastro-

# Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

intestinaux, protéger le tissu associé. Il s'agit donc d'une réorganisation tant de la hiérarchie des cibles de l'irradiation que du mécanisme de mort : l'apoptose des cellules endothéliales contrôle la destruction du tissu associé par l'irradiation à forte dose.

## ***Une signature spécifique pour l'apoptose vasculaire***

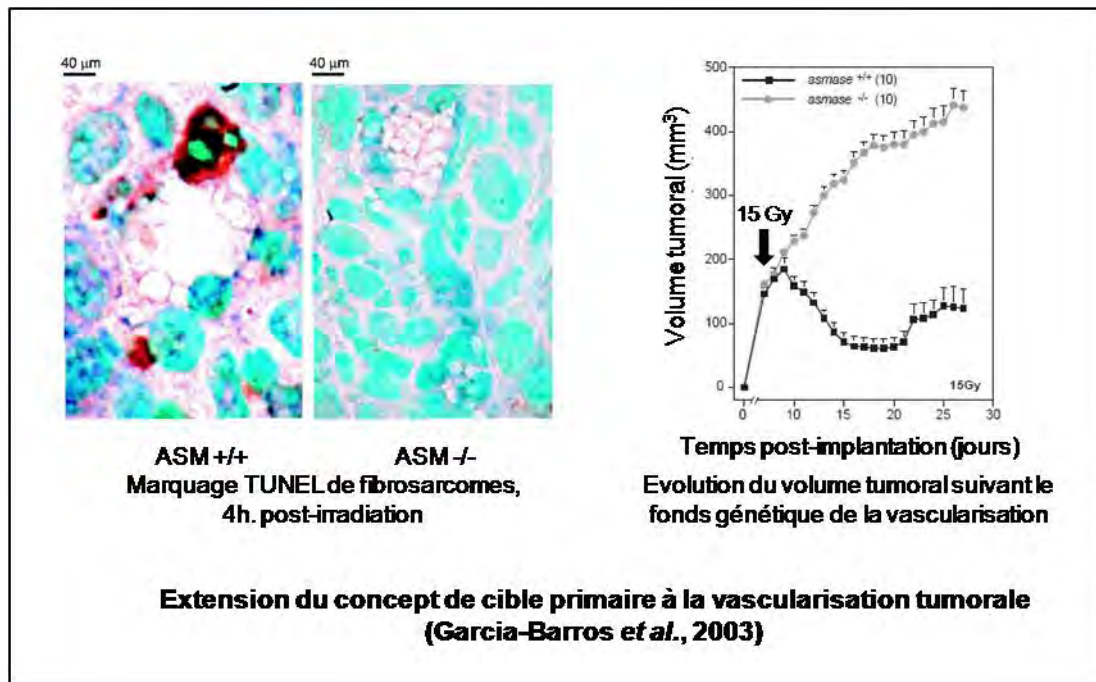
La protection de l'endothélium dans les différents systèmes in vivo évoqués peut, de façon alternative à la protection pharmacologique, être obtenue également par invalidation génétique d'une enzyme, la sphingomyélinase acide. Ceci est illustré dans les marquages de l'apoptose présentés ci-dessous :



## ***L'extension du modèle à la vascularisation tumorale dans les modèles de tumeurs***

Ces résultats montrent qu'une voie d'apoptose spécifique semble à l'œuvre dans la réponse de l'endothélium à l'irradiation à forte dose. Mais surtout, ces résultats ont été étendus à des modèles de tumeurs xéno greffées, dans lesquels une irradiation à 15 Gy provoque la mort de l'endothélium et la régression tumorale, phénomènes abolis dans les souris invalidées génétiquement pour la sphingomyélinase acide. Ceci est illustré avec des fibrosarcomes (cellules MCA129) :

# Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium



Ces résultats proposent donc un nouveau cadre théorique dans lequel inscrire la radiothérapie à forte dose. Ils montrent que celle-ci ne peut être considérée comme une simple extension des résultats aux faibles doses, puisqu'à 15 Gy, on assiste à une réorganisation des cibles de l'irradiation, la mort de l'endothélium vasculaire semblant jouer un rôle accélérateur sur la mort du tissu associé, que ce dernier soit pulmonaire, intestinal ou tumoral. Cette mort semble en outre reposer sur un mécanisme original. (Garcia-Barros *et al.*, 2003)

## 2) Implication de la voie ASM/céramide dans la mort de l'endothélium

Comment comprendre l'implication de la sphingomyélinase acide dans ce processus de mort ?

### 1. Le cycle métabolique de base :

La sphingomyélinase acide est une enzyme qui a d'abord été étudiée dans le cadre du métabolisme d'une catégorie spécifique de lipides, les sphingolipides. Cette famille de lipides a été découverte tardivement : alors que dès 1854, la réaction de base permettant la synthèse des triglycérides est réalisée *in vitro* (en combinant un acide gras au glycérol), ce n'est qu'en 1885 que Thudichum isole les premiers représentants de la famille des sphingolipides, la sphingosine et la sphingomyéline, dans le cerveau. Des avancées sporadiques vont marquer la première moitié du XXe siècle, avec la résolution de la structure de la sphingomyéline (1914), puis de la sphingosine (1947). Mais l'une des découvertes majeures est la connexion entre l'accumulation des sphingolipides et diverses pathologies [], comme la sphingomyéline dans le syndrome de Niemann-Pick (1934). Ceci conduit à des approches biochimiques pour purifier les enzymes responsables de la synthèse et de la dégradation de cette molécule (respectivement en 1963 et 1966). Le cycle métabolique des sphingolipides s'ébauche alors :

Il existe un unique point d'entrée métabolique: il aboutit à la synthèse d'un « squelette », la sphingosine, sur lequel vient se greffer un acide gras, formant le céramide. Celui-ci sert de base à la



## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

synthèse de la sphingomyéline (en ajoutant une phosphorylcholine au céramide), et des gangliosides (en ajoutant un sucre au céramide), qui constituent à eux deux % des lipides membranaires. Ces sphingolipides complexes peuvent être dégradés pour recycler leurs constituants de base. Les sphingolipides sont donc fondamentalement constitués de 3 blocs, une base sphingoïde, une longue chaîne carbonée issue d'un acide gras et une tête hydrophile (**Hannun et Obeid, 2008**).

Figure type Hannun EMBO 2004

Mais l'enchaînement précis des réactions et leur localisation subcellulaire ne seront entièrement décrits que dans les années 80, c'est-à-dire en même temps que les avancées de la biologie moléculaire permettent le clonage généralisé des enzymes impliquées dans l'ensemble du métabolisme.

### ***La voie de novo :***

On qualifie ainsi les premières étapes du cycle des sphingolipides, menant à la synthèse du céramide. La première réaction permet la formation du squelette sphingosine, en condensant la sérine avec le palmytyl-coenzyme A, pour former la 3-kétosphinganine, elle-même convertie en dihydrosphingosine (**Merhill et al., 1986**). Ce squelette est acétylé sur le second carbone de la dihydrosphingosine, formant ainsi le dihydrocéramide, lui-même éventuellement désaturé pour former le céramide (**Michel et al., 1997**).

Si les données biochimiques convergeaient vers une localisation golgienne de l'ensemble des réactions, ce n'est qu'en 1992 que l'équipe de Sandhoff a établi la topologie de ces réactions : les trois premières enzymes impliquées dans la voie *de novo* sont situées sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique (**Mandon et al., 1992**). Ce résultat a par la suite été également démontré pour l'enzyme catalysant le passage du dihydrocéramide au céramide (**Michel et Van Echten-Deckert, 1997**).

Le céramide avec sa double chaîne carbonée, s'ancre dans la membrane, et son hydrophobicité est trop élevée pour empêcher son transfert spontané vers le cytosol (« désorption »), même s'il est capable de mouvements spontanés (moyennement rapides : demi-vie de 22 min contre 70 ms pour le diacylglycérol, référence en matière de translocation membranaire) d'un feuillet à l'autre de la membrane (**Van Meer et Holtuis, 2000**).

### ***Les étapes golgiennes :***

Les étapes suivantes dans le cycle de la sphingomyéline prennent place dans le compartiment golgien. Le décryptage de ces étapes s'est heurté à deux problèmes majeurs : la transit du céramide entre réticulum endoplasmique et golgi, et l'identification de l'enzyme responsable de la synthèse de la sphingomyéline à partir du céramide (**Futerman et Hannun, 2004**).

Le passage du céramide du réticulum au golgi, où il est métabolisé, ne peut se faire par diffusion, le céramide étant piégé dans les membranes du réticulum où il est synthétisé, même s'il est capable de basculer spontanément d'une face à l'autre d'un double feuillet membranaire en quelques secondes. Les déplacements intracellulaires des lipides s'effectuent selon 3 modalités (**Van Helvoort et Meer, 1995**) : la diffusion latérale (restreinte à l'intérieur d'un organe), le flux

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

vésiculaire connectant réticulum, golgi, membranes plasmiques, endosomes et lysosomes, et enfin la diffusion sous forme de monomères.

Les modèles de transport du céramide entre réticulum et golgi doivent s'accommoder d'une contrainte topologique, à savoir l'emplacement exact des réactions suivantes dans la chaîne métabolique. Alors que la synthèse de glucosylcéramide prend place sur la face externe du golgi, la synthèse de sphingomyéline se déroule, elle, du côté luminal.

Le transport vésiculaire permet d'expliquer comment le céramide (ou le dihydrocéramide) alimente la voie de synthèse des gangliosides, mais par contre, l'alimentation de la voie de la sphingomyéline semble dépendante d'un transporteur protéique spécifique, appelée CERT, qui extrait le céramide des membranes du réticulum et le convoie jusqu'aux membranes golgiennes (**Hanada et al., 2003**). Le mécanisme de transfert du céramide vers le feuillet luminal où la réaction de synthèse de la sphingomyéline se produit est mal défini (**Hannun et Luberto, 2004**). L'utilisation différentielle du céramide selon sa voie de transport pourrait être conditionnée par la répartition des enzymes à l'intérieur du golgi: la synthèse du glucosylcéramide prend place dans la partie proximale du golgi (Cis) tandis que la synthèse de la sphingomyéline a lieu dans la partie distale (trans) du golgi. Les CERT pourraient n'atteindre leurs cibles qu'au point de contact entre réticulum et partie trans du golgi, et jouer en outre un rôle de positionnement spécifique du céramide vis-à-vis de l'enzyme synthétisant la sphingomyéline. L'adressage est permis d'un côté par les protéines VAP, ancrées dans le réticulum, et reconnues par le domaine FFAT du transporteur, de l'autre par les phosphatidyl-inositol-4-phosphate de la membrane golgienne, reconnus quant à eux par le domaine PH de CERT. Entre les deux, un domaine de liaison aux lipides dans lequel est supposé s'insérer le céramide (**Hanada et al., 2007**).

Le céramide golgien se retrouve donc à un carrefour métabolique, entre synthèse des gangliosides et voie de la sphingomyéline :

- soit il sert de base à la synthèse des gangliosides, par ajout d'un glucose au premier carbone du céramide, une réaction prenant place sur la face cytosolique du Cis-golgi (**Coste et al., 1986**). Il est ensuite transloqué sur la face luminale, où la synthèse se poursuit par l'ajout d'un galactose, formant le lactosylcéramide, à partir duquel les autres gangliosides vont être formés par ajout successif de glycolipides au sein du golgi (**Hüwiler et al., 2000**). Un modèle alternatif, basé sur le suivi de Glc-céramide radiomarqué, propose qu'il soit ramené jusqu'au réticulum endoplasmique par un transporteur, FAPP2, où il est transloqué sur la face luminale et réexpédié vers le Golgi (**Halter et al., 2007**)

- soit il reçoit la tête phosphorylcholine de la phosphatidylcholine, donnant ainsi la sphingomyéline. L'isolement de la sphingomyéline-synthase a représenté un défi majeur pour le champ, les approches visant à isoler des mutants défectueux pour cette voie ayant en fait surtout mis en évidence des acteurs de la voie amont (sérine-palmitoyl-transférase, CERT). C'est finalement une approche de clonage par homologie avec les enzymes responsables d'une réaction apparentée dans différents organismes modèles qui va permettre d'isoler les deux formes de la sphingomyéline-synthase (**Huitema et al., 2004**). L'ajout d'un groupement polaire se traduit par la perte de la capacité de translocation membranaire (en fait, un allongement de la demi-vie à 3h) de la sphingomyéline, qui est donc piégée dans le feuillet vacuolaire de la membrane.

# Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

## *Atteindre la membrane plasmique*

Les preuves expérimentales convergent vers un transport de la sphingomyéline du Golgi à la membrane plasmique par le flux vésiculaire : par exemple, le transport de la sphingomyéline est interrompu dans les cellules mitotiques, ou soumises à la Brefeldine A, deux conditions dans lesquelles le transport vésiculaire est bloqué. C'est d'ailleurs en utilisant des formes modifiées de sphingomyéline que la notion de flux vésiculaire brut, non adressé, et permettant d'alimenter la membrane plasmique en lipides, a pu être forgée (**Wieland *et al.*, 1987** et **Karrenbauer *et al.*, 1990**). La sphingomyéline et les glycosphingolipides empruntent donc les granules de sécrétion qui connectent Golgi et membrane plasmique, un flux vésiculaire qui constitue l'un des principes-clés du modèle général d'explication du trafic intracellulaire élaboré par Palade dans les années 50.

Par contre, les mécanismes qui conditionnent la topologie membranaire des protéines, c'est à dire le franchissement des membranes via une machinerie de translocation qui reconnaît des peptides-signal, accompagné d'éventuels insertions et clivages (**Mellman et Warren, 2000**), ne peut être appliqué aux lipides. On considère que la topologie des lipides est déterminée par plusieurs paramètres : le feuillet membranaire dans lequel leur synthèse intervient, leur capacité à se transloquer spontanément d'un feuillet à l'autre, la présence éventuelle de protéines de capture ou de translocation, leur redistribution par des flux vésiculaires ou des échanges monomériques directs, par diffusion ou par des transporteurs (review **Van Helvoort et Van Meer, 1995**). Si ces paramètres ne sont pas à l'heure actuelle parfaitement définis pour l'ensemble des lipides, ils permettent cependant assez bien d'expliquer la répartition de la sphingomyéline et des glycosphingolipides : tous deux sont synthétisés sur la face luminale du Golgi, et sont incapables de se transloquer vers le feuillet cytoplasmique. Leur transport vésiculaire n'affecte donc pas leur topologie, et ils se retrouvent localisés dans le feuillet externe de la membrane plasmique.

Ils y sont entourés par les glycérophospholipides, qui constituent la masse des lipides membranaires (au moins la moitié des lipides de la membrane plasmique). Ils sont constitués d'un squelette hydrophobe (le diacylglycérol) et d'une tête polaire. Dans un milieu aqueux, ils s'organisent spontanément en une bicouche lipidique, les têtes polaires orientées vers le milieu aqueux (**Van Meer *et al.*, 2008**). La phosphatidylcholine se concentre essentiellement dans le feuillet externe (son lieu de synthèse dans le compartiment golgien). A l'opposé, la phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine sont majoritairement localisées dans le feuillet interne (la compréhension de cette asymétrie des phospholipides est plus difficile. Il semble qu'initialement, les phospholipides adoptent une distribution homogène dans les deux feuillets de la membrane du réticulum endoplasmique, via une flippase bidirectionnelle. Puis une ségrégation intervient, contrôlée par des translocases spécifiques des aminophospholipides vers le feuillet cytoplasmique (**Van Meer, 2000**). Enfin, le cholestérol, dernier constituant majeur des membranes, est certainement celui pour qui le plus de questions restent ouvertes : il est synthétisé dans le réticulum endoplasmique comme la majorité des lipides, mais sa concentration y est peu élevée. Il emprunte ensuite des voies de transport jusqu'à la membrane plasmique mal comprises, rapides mais majoritairement insensibles aux inhibiteurs classiques de la voie de sécrétion. On ignore s'il s'agit d'un transport vésiculaire atypique ou d'un transport non-vésiculaire, comme cela semble être le cas chez la levure (**Baumann *et al.*, 2005**), mais il s'agit d'un transport rapide, de l'ordre de 10 minutes (**DeGrella et Simoni, 1982**). La topologie membranaire du cholestérol reste également sujette à controverse (**Van Meer *et al.*, 2008**), notamment en raison de la rapidité supposée du transfert spontané du cholestérol entre les deux feuillets membranaires (de l'ordre de la seconde dans les érythrocytes- **Steck *et al.*, 2002**).

L'accumulation du cholestérol et des sphingolipides (et glycosphingolipides) dans la membrane plasmique est expliquée par la notion de co-ségrégation : Les sphingolipides s'agrègeraient au

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

cholestérol au niveau de feuillet luminal des membranes golgiennes et ces agrégats seraient ainsi concentrés dans les vésicules antérogrades, s'accumulant de ce fait dans les membranes plasmiques (**Van Helvoort et Van Meer, 1995**).

On aboutit au final à une membrane plasmique profondément différente de celle du réticulum endoplasmique : elle est enrichie dix à vingt fois en sphingolipides et cholestérol (**Killian et Van Meer, 2001**), et présente une profonde asymétrie avec un feuillet luminal concentrant les sphingolipides et glycosphingolipides, ainsi que la phosphatidylcholine, tandis que le feuillet cytoplasmique concentre la phosphatidylsérine et la phosphatidylcholine (**Van Helvoort et Van Meer, 1995**).

### **La voie de recyclage :**

Si la membrane plasmique est alimentée en permanence par les vésicules et les transporteurs protéiques, elle est également à l'origine d'un flux permanent de vésicules : on estime que l'intégralité de la membrane plasmique est internalisée avec une demi-vie de 15 à 30 minutes (**Maxfield et Mondal, 2006**). La mieux définie de ces voies est l'endocytose médiée par les récepteurs, qui se caractérise par la formation d'un puits recouvert de clathrine sur sa face cytoplasmique. Elle constitue le pendant logique de la voie de sécrétion, et ces deux voies ont historiquement servi de fondements au modèle historique des flux vésiculaires intracellulaires (**Mellman et Warren, 2000**). Pourtant, plus de la moitié de la surface membranaire endocytée pourrait l'être par des mécanismes indépendants de la clathrine, parmi lesquels seuls les plus spécialisés (phagocytose, lamellipodes, ...etc.) ont été définis (review **Maxfield et McGraw, 2004**).

Les vésicules fusionnent en un compartiment désigné sous le terme « endosome de tri » (sorting endosome). Ces structures situées en périphérie de la cellule se distinguent par :

- leur pH acide (~6), qui entraîne la dissociation des ligands d'avec leurs récepteurs. Les ligands rejoignent le matériel soluble endocyté dans la lumière endosomale
- des extensions tubulaires étroites, qui excluraient le matériel luminal. Les vésicules qui en émergent permettent le recyclage de la majorité des membranes et protéines membranaires. Il s'agit donc d'un mécanisme d'adressage distinct des systèmes de peptide-signal (utilisé par les protéines dans la voie de sécrétion) et d'interaction préférentielle (utilisé par les lipides et le cholestérol, toujours dans la voie de sécrétion) : ici, le tri semble s'opérer selon un simple principe géométrique. Une grande partie des sphingolipides est donc rapidement recyclée vers la membrane (**Koval et Pagano, 1989** et **Mayor et al., 1993**), le reste poursuit son trajet dans la voie de dégradation.

Après avoir agrégé des vésicules d'endocytose pendant 5 à 10 minutes, les endosomes « de tri » entament un processus de maturation : ils migrent vers le centre de la cellule via un guidage par les microtubules, et s'acidifient. Ils acquièrent également un vaste panel d'hydrolases acides, devenant alors des « endosomes tardifs » (**Maxfield et McGraw, 2004**). Ces endosomes tardifs reçoivent également un flux vésiculaire issu du Golgi. Dans ce dernier, des protéines possédant un signal spécifique (le mannose-6-phosphate) sont déroutées par un système de récepteurs interagissant avec la clathrine, qui enveloppe les molécules et les adresse vers les endosomes tardifs. Ces protéines sont en fait majoritairement des hydrolases.

Les endosomes tardifs se différencient finalement en des vacuoles denses, chargées d'hydrolases. Ce sont les lysosomes, dans lesquels un vaste panel d'hydrolases adressées spécifiquement dégrade les biomolécules complexes. C'est d'ailleurs en tant que compartiments de la « dégradation terminale » que les lysosomes ont été initialement définis par De Duve, avant de se

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

voir dotés d'une définition fonctionnelle, en tant que destination intracellulaire finale des protéines solubles internalisées par endocytose. On les définit actuellement comme des vacuoles plus denses que les endosomes, et possédant une large gamme d'hydrolases, et quelques marqueurs spécifiques (comme les glycoprotéines lgp) (**Kornfeld et Mellman, 1989**).

Les hydrolases lysosomiales sont majoritairement activées par clivage protéolytique lorsqu'elles atteignent le compartiment lysosomal. Un glycocalyx important, constitué de glycoprotéines membranaires ou associées à la membrane, protège la membrane délimitant le périmètre des lysosomes de la digestion enzymatique... mais il est également de ce fait difficilement concevable que les lipides la constituant soient exposés aux enzymes. La vision actuelle de la dégradation des lipides membranaires postule l'existence de vésicules intra-lysosomiales, qui rassembleraient une partie des lipides et les exposeraient à l'hydrolyse.

D'autres caractéristiques du compartiment lysosomal semblent jouer un rôle important dans les processus d'hydrolyse : le pH s'abaisse constamment, des lipides chargés négativement (désignés par le bis-monoacyl-glycéro-phosphate, ou BMP) s'accumulent au sein des vésicules, la concentration en cholestérol baissant quant à elle. Quand on perturbe un de ces éléments, le système d'hydrolyse des sphingolipides est altéré, et ils s'accumulent, un phénomène observé dans de nombreuses pathologies de surcharge lysosomiales, souvent liées à un défaut dans les transporteurs du cholestérol (NPC1 ou 2).

Expérimentalement, on peut de même perturber l'action des enzymes de digestion des sphingolipides par l'action de drogues cationiques amphiphiles, qui viendraient s'insérer entre les BMP des vésicules, et les enzymes comme la sphingomyélinase, qui utiliseraient les BMP comme point d'ancrage. Relarguées dans les lysosomes, les enzymes seraient alors elles-mêmes dégradées (**Schulze et al., 2009**). Un tel mécanisme a pu être suggéré pour la désipramine notamment, suite à des études par résonance plasmatique, montrant que cette molécule déplace la sphingomyélinase de son association avec une bicouche lipidique (**Hurwitz et al., 1994**).

Parmi les nombreuses enzymes présentes au sein des lysosomes, un certain nombre joue un rôle-clé dans la dégradation des sphingolipides.

Les sphingolipides complexes sont pris en charge par une série d'hydrolases spécifiques, aboutissant, en clivant les sucres, à la formation de glucosylcéramide et galactosylcéramide. Des  $\beta$ -galactosidases et glucosidases hydrolysent ensuite ces lipides et génèrent le céramide (**Hannun et Obeid, 2008**).

La sphingomyéline est, elle aussi, dégradée pour former le céramide. La présence d'une activité enzymatique capable de cliver la sphingomyéline a été montrée dès 1940 (**Tannhauser et Reichel, Reichel et Tannhauser, 1940**).

Diverses activités enzymatiques variant par leur pH optimal et leur distribution tissulaire seront ensuite identifiées, mais c'est durant les années 1960 que ce champs de recherche va connaître un double tournant : d'abord, avec la purification d'une enzyme à activité sphingomyélinase, fonctionnant à pH acide (**Gatt, 1963**), identifiée ensuite comme une glycoprotéine localisée dans les endosomes tardifs et les lysosomes (**Fowler, 1969**).

A la même période, un déficit dans l'activité de cette enzyme s'avère responsable du syndrome héréditaire de Niemann-Pick, (**Brady et al., 1966**). Le premier cas identifié de cette pathologie remonte au début du XXe siècle, puis dès les années 30 on repère une accumulation de sphingomyéline dans les tissus des patients, et le syndrome est rattaché aux pathologies de surcharge lysosomiale (on considère à l'heure actuelle que l'accumulation de sphingomyéline entraîne ensuite des accumulations secondaires d'autres lipides comme le cholestérol et les

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

gangliosides). Le syndrome de Niemann-Pick se présente sous deux formes, traduisant apparemment un déficit plus ou moins important en sphingomyélinase : dans le type A, qui est une forme infantile, des atteintes neurologiques entraînent un décès avant l'âge de trois ans, tandis que dans le type B, qui touche des patients plus âgés, la pathologie est progressive, plus limitée, avec une hépatosplénomégalie et des atteintes pulmonaires (**Sabourdy et al., 2008, Smith et Schuchman, 2008**).

La seconde phase décisive dans l'étude du rôle physiopathologique de la sphingomyélinase acide va démarrer à la fin des années 80, quand un niveau de purification suffisant est atteint (**Quintern et al., 1987**), pour pouvoir réaliser un micro-séquençage qui va ensuite conduire à l'isolement de l'ADNc (**Quintern et al., 1989** et **Schuchman et al., 1991**) puis du gène codant pour l'enzyme, *smpd1* (**Schuchman et al., 1992**). Les preuves fonctionnelles sont apportées à la fois par l'identification de mutations dans le gène *smpd1* chez les patients atteints souffrant de Niemann-Pick (**Levrant et al., 1991** et **Levrant et al., 1993**), par l'obtention de souris invalidées génétiquement pour le gène *smpd1* et présentant des caractéristiques pathologiques communes avec le syndrome humain (**Otterbach et Stoffel, 1995** et **Horinouchi et al., 1995**), et enfin par la correction des déficits métaboliques de cellules issues de patients souffrant du syndrome par transfection du gène *smpd1* non muté (**Suchi et al., 1992**).

En parallèle, la connaissance du processus de maturation du polypeptide codé par le gène *smpd1* a progressé. L'étude des glycosylations du polypeptide a révélé la présence de résidus mannose-6-phosphate, une caractéristique des protéines lysosomiales (**Ferlinz et al., 1997**). Le mécanisme d'adressage au lysosome de la sphingomyélinase acide emprunte donc la voie des récepteurs mannose-6-phosphate, mais également un récepteur atypique, la sortiline (**Ni et Morales, 2006**). Au cours de son transport, le précurseur de la sphingomyélinase acide subit deux clivages successifs, passant de 75 kDa à 72 kDa au sein du réticulum et du golgi, puis enfin à 70 kDa après un ultime clivage dans le lysosome (**Hurwitz et al., 1994**).

Une forme alternative de la sphingomyélinase acide, sécrétée, existe. Dès 1983, on mesure son activité dans le surnageant de fibroblastes en culture (**Weitz et al., 1983**), puis dans le sérum de veau fœtal (**Spence et al., 1989**), et enfin dans des modèles de culture exposés à des cytokines inflammatoires (**Marathe et al., 1998**). L'hypothèse que la forme sécrétée et la forme lysosomiale soient issues d'un épissage alternatif est exclue lorsque l'on montre que la transfection de l'ADNc codant pour l'enzyme lysosomiale entraîne également l'augmentation de la forme sécrétée. Ceci est confirmé par l'absence de forme sécrétée dans les cellules issues des souris invalidées génétiquement pour la sphingomyélinase acide (**Schissel et al., 1996**), et exclut également a fortiori le modèle issu de *C.elegans*, dans lequel chaque forme est codée par un gène distinct (**Lin et al., 1998**). C'est à partir de l'étude de la dépendance au zinc que va être partiellement élucidé la relation entre les deux formes de l'enzyme : on considérait que la sphingomyélinase lysosomiale était indépendante du zinc pour son activité, mais une étude biochimique approfondie montre qu'elle y est en fait fortement complexée, durant son transport jusqu'au lysosome, à la différence de la sphingomyélinase sécrétée. Cette dernière doit donc emprunter une voie non lysosomiale, probablement la voie de la sécrétion classique via le golgi (même si une partie de la sphingomyélinase acide sécrétée semble avoir accès à un stock intracellulaire de zinc dans les cellules endothéliales). Ceci est confirmé par son profil glycosidique (oligosaccharides complexes plutôt qu'oligosaccharides N-liés riches en mannose-6-phosphate), typique d'une protéine empruntant la voie de sécrétion. De plus, la sphingomyélinase sécrétée subit une maturation protéolytique distincte de la forme lysosomiale (**Schissel et al., 1998**). Le routage différentiel se ferait alors par un « défaut de fonctionnement » (ou échappement, ou saturation) de la N-acétyl-glycosamine-1-

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

phosphotransférase. Ce phénomène, fréquent pour les enzymes lysosomiales, est confirmé expérimentalement par deux types d'expériences :

- si on inhibe l'adressage par la sortiline, on constate une augmentation de la sécrétion de la sphingomyélinase acide, ce qui suggère une saturation du système d'adressage lysosomal classique par les mannose-6-phosphate (**Ni et Morales, 2006**).

- chez les patients ICD, pour lesquels la -acétyl-glycosamine-1-phosphotransférase est défectueuse, on retrouve un excès d'enzymes lysosomiales dans les fluides (**Lightbody et al., 1971**).

Enfin, il est important de noter que si la Km de l'enzyme est maximale à pH acide, sa Vmax est inchangée à pH neutre, ce qui rend possible le fonctionnement de l'enzyme sécrétée (**Schissel et al., 1998**).

Pour clore ces données de base sur la sphingomyélinase, il est utile de mentionner l'existence d'un sphingomyélinase neutre. Comme pour la sphingomyélinase acide, des données expérimentales ont très tôt suggéré l'existence d'une enzyme capable d'hydrolyser la sphingomyéline : dès 1967, une activité sphingomyélinase, fonctionnant à pH neutre et dépendante du magnésium, est retrouvée dans des extraits de rate humains, et notamment parmi une partie des patients souffrant de Niemann-Pick, suggérant que l'enzyme est codée par un gène distinct de celui codant pour la sphingomyélinase acide.

Ces résultats seront confirmés expérimentalement une fois l'identification de la sphingomyélinase achevée, en montrant que les souris invalidées génétiquement pour *smpd1* possèdent encore une activité sphingomyélinase neutre (**Levade et al., 1991**).

Les approches de purification de l'enzyme suggèrent l'existence de plusieurs isoformes, mais leur clonage s'est avéré difficile. Après l'identification d'un premier gène supposé coder l'enzyme (désigné comme N-SMase 1, « neutral sphingomyelinase 1 ») puis la réfutation du fait que l'enzyme possède une véritable activité de type sphingomyélinase (respectivement : **Tomiuk et al., 1998** et **Sawai et al., 1999**), deux gènes codant pour des sphingomyélinases neutres vont être clonées successivement (N-SMase 2 : **Hofmann et al., 2000** et N-SMase 3 : **Krut et al., 2006**). Toutes deux possèdent cette fois une activité de type sphingomyélinase neutre (**Clarke et Hannun, 2006**). Les premiers résultats de purification suggéraient que la sphingomyélinase neutre soit liée aux membranes (**Rao et Spence, 1976**), ce que semblent confirmer les structures des deux sphingomyélinases neutres, qui possèdent deux domaines transmembranaires. On considère donc généralement que les sphingomyélinases neutres sont associées aux membranes plasmiques, ou aux membranes endosomiales en dérivant (**Trajkovic et al., 2008**), et n'interviennent pas dans le processus de dégradation lysosomiale.

Le céramide, issu de l'action de la sphingomyélinase acide et des  $\beta$ -galactosidases et glucosidases, est piégé dans le compartiment lysosomal, où sa dégradation se poursuit sous l'effet des céramidases.

La céramidase possède de nombreuses caractéristiques communes avec la sphingomyélinase acide :

- son activité biochimique a été mise en évidence dès 1963

- sa déficience est responsable d'une pathologie de surcharge lysosomiale, la Maladie de Farber, un indice sur sa localisation lysosomiale et sa fonction dans le catabolisme des lipides ( ?)

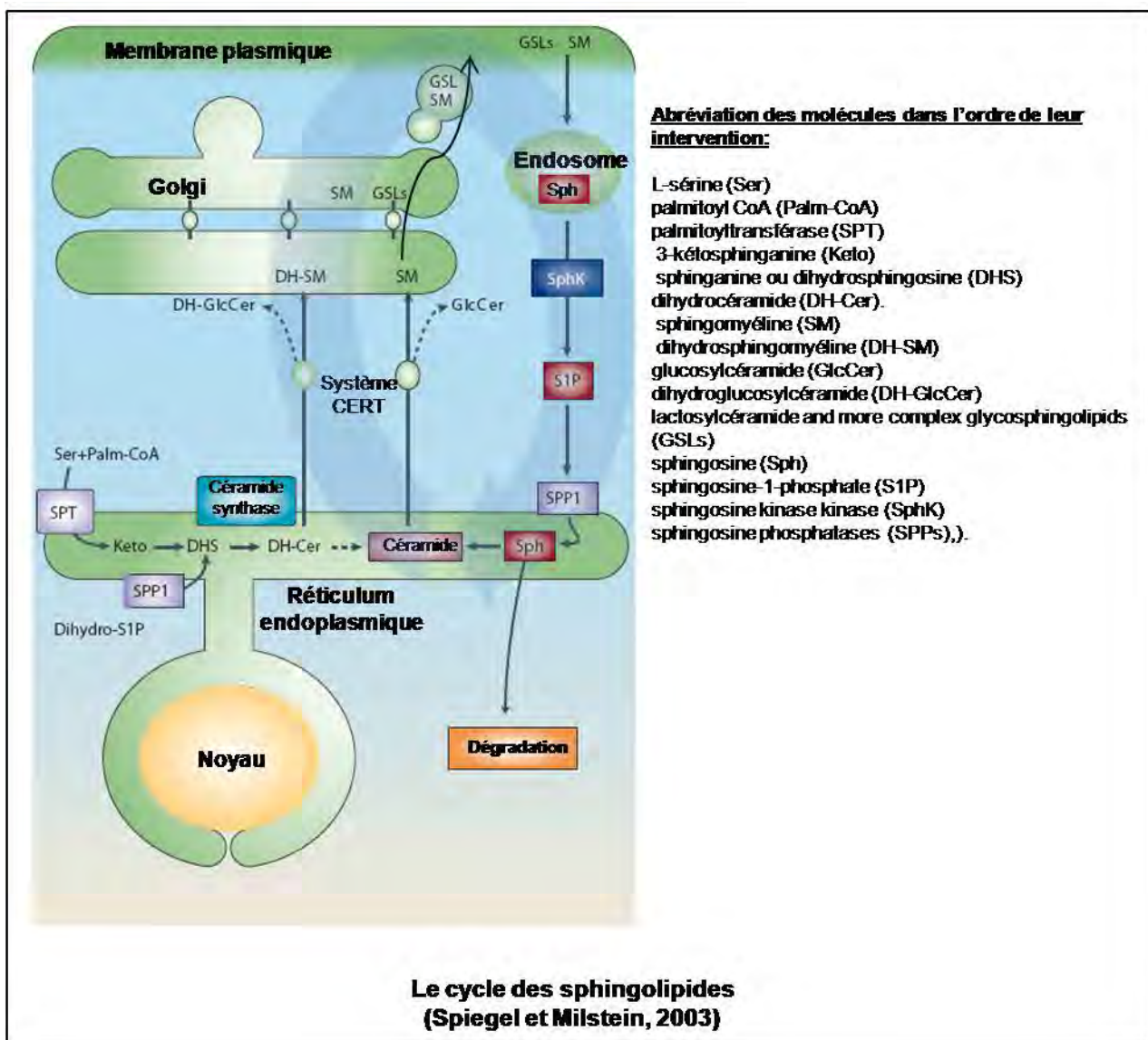
- sa purification avancée a permis de rapides progrès dans sa connaissance. La céramidase acide est synthétisée sous forme d'un polypeptide qui, lorsqu'il atteint le lysosome, est clivé en deux sous-unités. Cette étude montre également qu'une fraction mineure de l'enzyme ne suit pas l'adressage lysosomal et est sécrétée (**Bernardo et al., 1995**), un résultat confirmé spécifiquement dans les cellules endothéliales (**Romiti et al., 2000**).

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

- En parallèle, le gène *Asah1* codant pour la céramidase acide est isolé (Li *et al.*, **Genomics**, 1998), permettant la génération de souris déficientes génétiquement. Les souris homozygotes ne sont pas viables, mais les hétérozygotes présentent des symptômes d'accumulation lipidique, cohérents avec le rôle causal de la céramidase acide dans la maladie de Farber (Li *et al.*, 2002).

- quatre autres formes de céramidases existent, toutes codées par un gène spécifique : une céramidase neutre et localisée à la membrane plasmique (Hwang *et al.*, 2005) et trois formes alcalines localisées dans le réticulum endoplasmique et/ou le golgi (Mao et Obeid, 2008).

La sphingosine diffuse vers le cytoplasme, où les sphingosine-kinases 1 et 2 (dont les localisations semblent variées : noyau, cytosol,...etc., Hla *et al.*, 2008) catalysent la formation de la sphingosine-1-phosphate (S1P), qui dans certains types cellulaires peut être synthétisée en abondance et secrétée dans le sérum, ou peut être clivée par la sphingosine lyase du réticulum, achevant ainsi le cycle métabolique : la dégradation de la sphingosine est le point principal de sortie du cycle des sphingolipides (Hannun et Obeid, NRMCB, 2008), ou de recyclage pour la synthèse de nouveaux sphingolipides.





# Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

## 2. Le basculement vers une voie de transduction :

### Les cellules leucémiques et la génération de céramide

La conception du rôle des sphingolipides va profondément évoluer au cours des années 90. Le paradigme en matière de signalisation médiée par les lipides a été établi en montrant comment l'hydrolyse du phosphatidylinositol par l'enzyme phospholipase C pouvait être déclenchée sous l'action de stimuli, entraînant alors la génération de deux messagers secondaires, le di-acyl-glycérol et l'inositol-tri-phosphate, chacun couplés à des effecteurs intracellulaires. On basculait ainsi d'une voie métabolique à une véritable voie de transduction.

Au cours des années 80, les prémises d'un remaniement des concepts prévalant dans le champ des sphingolipides sont posés à travers une série de publications de Hannun et Kolesnick, qui montrent que la sphingosine, dans les neutrophiles (**Wilson et al., 1986**) peut interférer avec la voie canonique de la PKC que nous venons d'évoquer, tandis qu'à l'inverse le métabolisme de la sphingomyéline semble pouvoir être régulé par une voie passant par les récepteurs à la TRH dans les cellules pituitaires GH3 (**Kolesnick, 1989**). Les sphingolipides sont désormais considérés comme des agents bioactifs.

Mais ce sont les travaux menés en utilisant comme modèles les lignées leucémiques (HL60 et U937) et leur potentiel de différenciation qui vont s'avérer les plus fructueux : les équipes de Hannun et Kolesnick vont en effet, au cours des années 1990, montrer que le cycle de la sphingomyéline peut constituer une véritable voie de transduction : après des premiers résultats montrant comment des sphingolipides comme la sphinganine ou la sphingosine (**Merrill et al., 1986**), ou une SMase exogène pouvaient moduler la différenciation des HL60, un pas décisif est franchi en montrant que l'activité enzymatique de la sphingomyélinase endogène est modulée lors de la différenciation monocyttaire des HL60, entraînant en parallèle une génération de céramide (**Okazaki et al., 1990**). Les signaux inducteurs conduisant à la différenciation des HL60 sont ensuite étendus au TNF- $\alpha$  et à l'INF- $\gamma$ , ainsi qu'à l'IL-1 $\beta$  (**Mathias et al., 1991**), et une cible moléculaire (c-Myc) est définie (**Kim et al., 1991**). On suspecte déjà que la sphingomyélinase impliquée dans la voie soit la neutre. Puis les résultats sont menés encore plus loin, en montrant que l'on peut récapituler, dans un système in vitro, l'action du TNF sur des fractions de membranes de HL60 (**Dressler et al., 1992**), et isoler ainsi une activité « CAPK » (ceramide activated protein kinase) en utilisant un fragment spécifique de l'EGFR (**Mathias et al., 1991**). Isoler la CAPK va constituer l'objet d'une série de travaux de l'équipe Kolesnick, qui en obtiennent une première purification (**Liu et al., 1994**), puis montrent que la CAPK est capable de fixer et de phosphoryler Raf-1, kinase contrôlant le déclenchement de la voie des MAPK (cf. ci-après) (**Yao et al., 1995**), avant une démonstration que la CAPK ne serait autre que KSR, une protéine-clé dans le contrôle de la voie des MAPK (**Zhang et al., 1997**). En parallèle, une autre cible, appelée CAPP (ceramide activated protein phosphatase) va être mise en évidence dans les cellules de gliomes T9 (**Dobrowsky et Hannun, 1992**) ; puis purifiée et identifiée comme étant la phosphatase PP2A (**Dobrowsky et al., 1993**), avant qu'on démontre finalement que l'on peut l'activer directement in vitro sous l'action de céramides à longues chaînes (**Chalfant et al., 1999**).

Cette série de résultats est extrêmement importante, car elle définit rigoureusement la sphingomyélinase et son produit, le céramide, comme relais dans les voies de transduction intracellulaires. Ces publications délimitent un certain nombre d'outils-clés dans l'analyse de la voie du céramide : le recours à un certain nombre d'activateurs amont comme le TNF- $\alpha$ , l'emploi de céramide (céramide à courte chaîne, C2, puis céramides naturels, C16) ou de sphingomyélinase exogènes, la détection de la génération du céramide éventuellement complétée par la mise en

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

évidence de la baisse concomitante de la sphingomyéline, et la preuve de l'activation directe des cibles moléculaires par le céramide.

Une importante distinction va être apportée par les travaux de l'équipe de Kronke (**Wiegmann *et al.*, 1994**), qui en utilisant le même modèle de cellules leucémiques que les équipes de Kolesnick et Hannun, démontrent que le récepteur au TNF- $\alpha$  est capable, via deux domaines protéiques distincts, d'engager deux types différents de sphingomyélinase :

- La neutre d'un côté, ce qui concorde avec son positionnement cytoplasmique. C'est elle qui est capable d'activer la voie MAPK dans ce modèle, qui sera ultérieurement raffiné avec la découverte d'un adaptateur protéique, FAN, reliant le récepteur à la sphingomyélinase neutre.

- l'acide de l'autre côté. Elle conduit, dans ce modèle, à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Elle implique une enzyme dont la localisation semble être le compartiment endosomal, via un mécanisme supposé d'internalisation du récepteur au TNF. C'est cette voie qui constitue l'objet de notre attention.

### La connexion apoptose/céramide :

Les travaux fondateurs défrichant la voie du céramide ont essentiellement utilisé des modèles de lignée leucémique avec comme fonction finale la différenciation : pourtant, à la même période, des premiers résultats délimitent ce qui constitue à l'heure actuelle le principal objet des recherches centrées sur la voie du céramide : le TNF- $\alpha$ , tout comme l'ajout de céramide synthétique, déclenche la mort cellulaire programmée dans les cellules leucémiques (**Obeid *et al.*, 1993**)

Les résultats montrant l'implication du céramide seront rapidement étendus à d'autres types cellulaires (**Jarvis *et al.*, 1994**), et la démonstration sera appuyée par l'utilisation de lymphoblastes de patients souffrant du syndrome de Niemann-Pick, et donc naturellement déficients pour la sphingomyélinase acide : ces cellules sont résistantes à l'apoptose (en l'occurrence radioinduite), une résistance levée si les cellules sont transfectées avec l'enzyme (**Santana *et al.*, 1996**). Les résultats seront enfin renforcés par les travaux menés par le groupe de Schuchmann, qui montrent que la céramidase acide, qui élimine le céramide s'accumulant dans les cellules, est l'un des gènes les plus précocement exprimés dans les cellules œufs fécondés : si la fertilisation n'a pas lieu, son expression s'abaisse, ce qui conduit, tout comme l'invalidation génétique de l'enzyme, à la destruction des cellules (**Eliyahu *et al.*, 2007**). Ces résultats montrent la mise en place précoce d'un axe céramide/apoptose dans l'embryon, et sont confirmés de façon spectaculaire dans les souris déficientes en sphingomyélinase acide, dont les femelles possèdent une quantité accrue de follicules dans les ovaires. Cette hyperplasie est le résultat de la suppression d'une voie de mort intrinsèque aux oocytes, et passant par la génération du céramide (**Morita *et al.*, 2000**).

Des modèles multiples impliquant aujourd'hui le céramide comme médiateur de l'apoptose, même si tous ne relèvent pas de la même voie. De même que nous avons montré la séparation entre les voies relevant de la sphingomyélinase neutre et acide, de même il est important de noter qu'un certain nombre de résultats impliquant la génération de céramide relèvent d'une activation de la voie de novo, c'est-à-dire de la céramide synthase. Montrée initialement dans la réponse des cellules leucémiques à un agent chimiothérapeutique, l'activation de la voie de novo doit être séparée de celle impliquant la sphingomyélinase : la génération du céramide est intracellulaire (au niveau du réticulum), et progresse selon une cinétique beaucoup plus longue que celle liée à la sphingomyélinase (dans le cas de la voie de novo, sur des échelles de 4 à 8h, alors que dans les

# Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

modèles d'activation de la sphingomyélinase acide, la génération se fait en quelques minutes) (**Bose et al., 1995**)

## La balance S1P/céramide

L'émergence du concept de rhéostat céramide/sphingosine-1-phosphate

Le basculement du statut du céramide, de métabolite à intermédiaire de signalisation, va conduire parallèlement à une réévaluation du rôle de la sphingosine-1-phosphate dans les cellules. Sur le modèle du céramide, on commence par évaluer les effets directs de la molécule sur les cellules : si on expose des fibroblastes à de la sphingosine, ils la métabolisent en sphingosine-1-phosphate, qui s'avère posséder une forte action mitogénique. Cet effet semble reproduit en exposant directement les cellules à de la sphingosine-1-phosphate (**Zhang et al., 1991**). Les conséquences de ces expériences sont doubles : elles montrent que la S1P ne peut être considérée comme un simple métabolite terminal des sphingolipides, mais bien comme une molécule bioactive, et pose dès les travaux initiaux le principe d'une identité entre S1P exogène et endogène.

Ces deux traits vont être encore accentués lorsque l'on démontre, en utilisant les modèles « classiques » d'intervention du céramide (cellules leucémiques U937 et HL 60 exposées au TNF $\alpha$ , à FasL), que la S1P exogène peut protéger les cellules des signaux induisant le céramide. Les travaux de l'équipe de Sarah Spiegel vont plus loin, puisqu'ils démontrent en outre que la sphingosine kinase, qui génère la S1P intracellulaire, a elle-aussi une action anti-apoptotique. Enfin, des expériences réalisées avec le TNF, et l'appui d'inhibiteurs pharmacologiques, montrent une régulation inverse des taux de céramide et de S1P, aboutissant à la formulation du concept de rhéostat céramide/S1P : la balance entre ces deux espèces déterminerait la survie ou l'apoptose des cellules (**Cuvillier et al., 1996**).

Comment les postulats sur lesquels s'appuie ce concept ont-ils évolué ?

*1er postulat : le céramide et la sphingosine-1-phosphate intracellulaires, modulateurs de l'apoptose*

La première assise du concept de rhéostat céramide/S1P est la capacité attribuée à chacune des deux molécules, lorsqu'elle générée en intracellulaire, à moduler l'apoptose. La partie précédente a détaillé les preuves multiples qui soutiennent ce rôle en ce qui concerne le céramide.

En ce qui concerne la S1P intracellulaire, de nombreux travaux ont démontré l'activation de la sphingosine kinase, qui la génère, en aval de récepteurs aux facteurs de croissance (**Olivera et Spiegel, 1993** : PDGF, ou **Edsall et al., 1997** : NGFR, par exemple). La sphingosine kinase est aujourd'hui largement considérée comme une kinase pro-survie (**Takabe et al., 2008**).

La S1P semble bloquer le déroulement de la mort programmée à une étape comprise entre FLICE et les caspases exécutrices (**Cuvillier et al., 1998**), quoiqu'on ne connaisse pas les détails de cette intervention. Ce statut universellement anti-apoptotique de la S1P intracellulaire pourrait néanmoins être réévalué à l'aune des résultats sur la moins étudiée des deux isoformes de la sphingosine kinase, la Sphk 2. En effet, sa surexpression comme son inhibition ont été décrites comme induisant l'apoptose (résumé dans **Takabe et al., 2008**).

*2<sup>e</sup> postulat : l'existence d'une balance entre céramide et sphingosine-1-phosphate*

Si on peut considérer comme relativement établis les rôles pro et anti-apoptotique du céramide et de la sphingosine-1-phosphate, l'existence d'un réel rhéostat à l'intérieur des cellules suppose :

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

L'existence d'une cible commune. Le rhéostat a initialement été décrit comme un antagonisme fonctionnel, mais un tel antagonisme pourrait intervenir à des étapes très distinctes de la mort programmée, et n'être rien d'autre qu'une action opposée. Les cibles moléculaires de la S1P, plus encore que celles du céramide, restent à établir précisément, conduisant même à la remise en cause du terme de « messenger secondaire » pour la S1P (**Ancellin et al., 2002**).

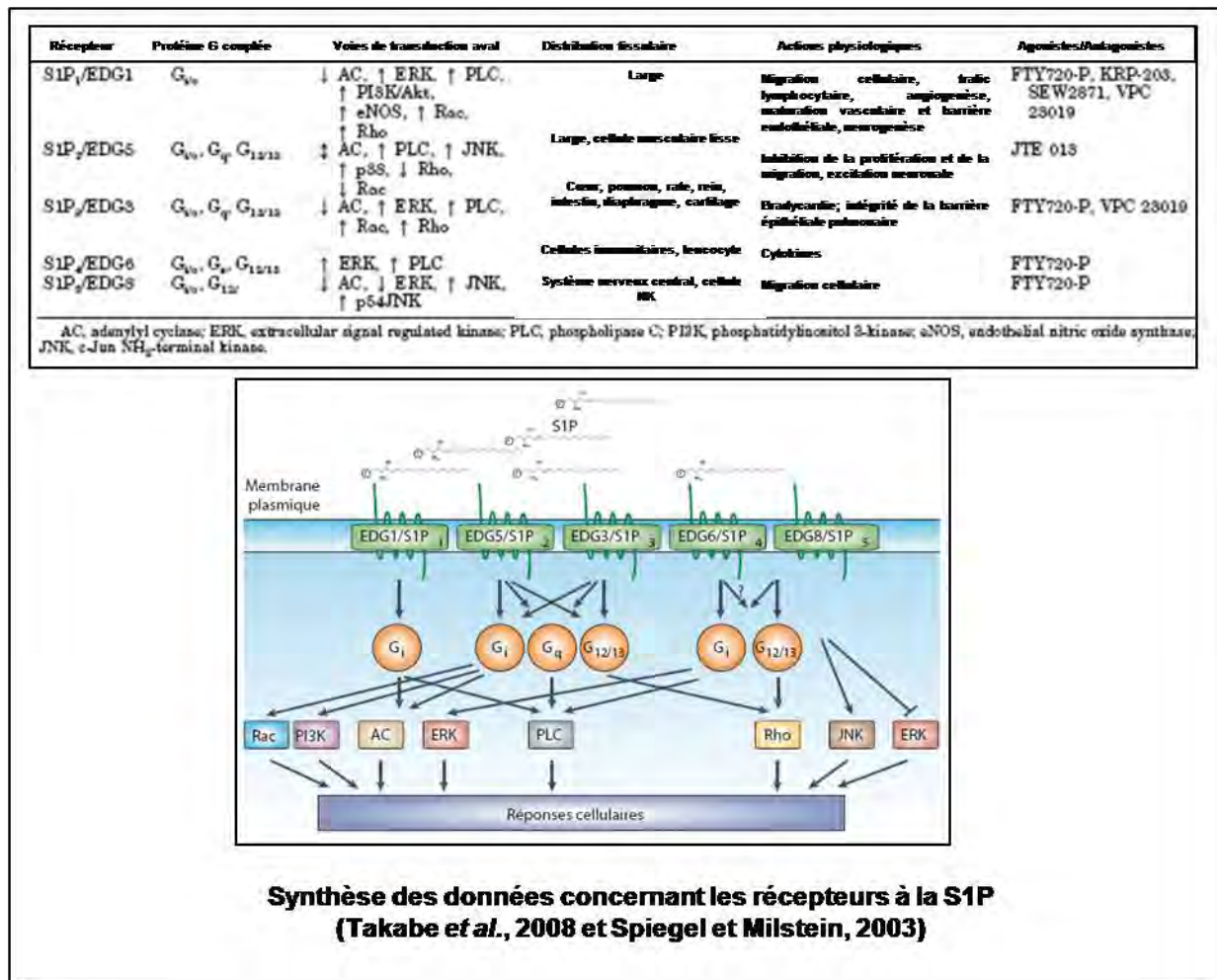
La régulation conjointe des deux espèces. A défaut de pouvoir définir précisément sur quel nœud moléculaire la S1P et le céramide interagissent, la notion de rhéostat pourrait être confortée par l'existence d'une régulation simultanée et inverse des deux voies. De tels cas sont peu nombreux : outre l'exemple du TNF $\alpha$ , étendu dans une publication aux cellules endothéliales (**Xia et al., 1999**), et le cas d'une drogue qui altère simultanément et inversement les niveaux de céramide et de sphingolipides à longues chaînes (**Mandala et al., 1997**), l'étude la plus aboutie montre que l'inactivation de la sphingosine kinase semble aboutir à une activation lente de la voie de novo, et donc à l'accumulation de céramide et de sphingosine, toxiques pour la cellule (**Taha et al., 2006**). Dans son acception strictement intracellulaire, le concept de rhéostat reste donc largement à explorer, en particulier pour des cinétiques rapides.

*3<sup>e</sup> postulat : l'identité entre sphingosine-1-phosphate exogène et endogène*

Le troisième aspect du modèle élaboré par Spiegel, et qui est sûrement celui qui a le plus évolué, est l'assimilation entre S1P intracellulaire et extracellulaire : le concept est initialement démontré en utilisant à la fois de la S1P et du céramide ajoutés comme agents pharmacologiques, et des modulateurs de la sphingomyélinase et de la sphingosine kinase.

Mais les études portant sur la S1P vont être bouleversées par la découverte d'un récepteur spécifique de la S1P, baptisé EDG-1 ou S1P1, et initialement isolé à partir des cellules endothéliales (**Lee et al., 1998**). Une famille de 5 récepteurs couplés à des protéines G, spécifiques et à forte affinité pour la S1P, va ainsi être identifiée, ainsi que leurs relais intracellulaires (**Takabe et al., 2008**).

# Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium



La S1P a ainsi acquis un nouveau statut, médiateur lipidique, et l'étude de sa production, de son transport, de sa dégradation et de ses effets physiologiques va être l'objet de recherches intensives au cours de la décennie écoulée.

La S1P se concentre dans le sang (de 0.2 à 0.9  $\mu\text{M}$  dans le plasma, de 0.4 à 1.1  $\mu\text{M}$  dans le sérum, **Schwab *et al.*, 2005**) et la lymphe (la concentration est le quart de la concentration sanguine, **Yatomi *et al.*, 1997**). La S1P s'associe à l'albumine et aux HDL.

La question des sources physiologiques de S1P a connu des remaniements récents : Les plaquettes ont été historiquement considérées comme la source physiologique de la S1P, souvent qualifiée de « médiateur lipidique dérivé des plaquettes ». En effet, les plaquettes exposées à la sphingosine la transforment rapidement en sphingosine-1-phosphate, stockée en grande quantité (notamment en raison d'un ratio très élevée entre sphingosine kinase et sphingosine lyase dans les plaquettes comparé aux autres types cellulaires), et la relarguent spécifiquement lorsqu'elles sont activées par la thrombine ou le collagène (**Yatomi *et al.*, 1995**).

Ce modèle va être révisé avec l'application de modèles murins au problème de la génération de la S1P. En effet, les souris invalidées pour le facteur de transcription E2, qui sont dépourvues de plaquettes, possèdent des taux inchangés de S1P dans le sang. A l'inverse, une invalidation génétique de la sphingosine kinase dans les érythrocytes semble montrer le rôle essentiel joué par ce type cellulaire, lui aussi dépourvu de sphingosine lyase (**Pappu *et al.*, 2007**).

Aux globules rouge est venu récemment s'adjoindre l'endothélium lui-même : l'équipe de Hla montre en effet que, si des souris invalidées pour les deux allèles de la sphingosine kinase 1 et un allèle sur deux de la sphingosine kinase 2 voient leur taux de S1P rétabli par une transfusion de moelle osseuse

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

issue de souris sauvages, à l'inverse, des souris sauvages irradiées ne subissent pas une baisse massive de S1P, suggérant l'existence d'une source alternative de production, que des expériences de réexpression de la sphingosine kinase dans les souris KO désignent comme étant l'endothélium (**Venkataraman et al., 2008**). Bien que ces données demandent confirmation, elles coïncident parfaitement avec les travaux réalisées in vitro, qui montrent que les cellules endothéliales, qui ne sécrètent pas de S1P, exportent en permanence la sphingosine kinase elle-même dans le compartiment extracellulaire (**Ancellin et al., 2002**). Des travaux complémentaires montreront qu'une seule isoforme de la sphingosine kinase, sur les cinq possibles, est exportée, et qu'on retrouve bien dans le plasma une activité sphingosine kinase, qui disparaît à 65% dans les souris invalidées pour la sphingosine kinase 1 (**Venkataraman et al., 2006**).

Les récepteurs à la S1P sont essentiellement exprimés dans le système vasculaire et la lymphe (**Liu et Hla, 1997**), et les cellules endothéliales et du système immunitaire sont les systèmes-clés pour comprendre les effets de la S1P circulante :

Le récepteur EDG-1 a été identifié en partant de cellules endothéliales, qui ont donc constitué le système privilégié pour comprendre son action : la S1P possède in vitro les caractéristiques d'un facteur pro-angiogénique classique : elle induit la migration (**Morales-Ruiz et al., 2001**), la prolifération (**Wang et al., 1999**), la formation de structures de type capillaire par la modulation des jonctions adhérentes et la survie (**Lee et al., 1999**) des cellules endothéliales de macrovaisseaux.

Mais comme nous l'avons présenté précédemment, l'impact de l'inactivation de l'EDG ne se manifeste pas dans les étapes initiales de l'angiogenèse (où son action est probablement compensée par les autres facteurs), mais lors de l'étape suivante de maturation des vaisseaux, où la S1P induit, via l'EDG-1, l'expression de molécules d'adhérence essentielles au recouvrement des vaisseaux par les péricytes (**Liu et al., 2000**). Le modèle de sécrétion de la sphingosine kinase, démontré par l'équipe de Hla, pourrait expliquer comment les vaisseaux en développement parviennent à générer de hauts gradients locaux de S1P, malgré la présence de lipoprotéines abaissant la quantité de S1P libre dans le sang. La potentialisation de l'angiogenèse dépendante du FGF-2, et la maturation des vaisseaux, observées dans les essais en matrigel utilisant des cellules transduites avec la sphingosine kinase tendent en ce sens (**Ancelin et al., 2002**).

Dans la vascularisation mature, la S1P renforce la jonction entre les cellules endothéliales selon un axe qui mène de l'EDG-1 au renforcement des jonctions adhérentes via les petites protéines G Rho et Rac (**Lee et al., 1999**).

Le récepteur EDG-1 est toutefois beaucoup moins exprimé dans les vaisseaux matures qu'au cours de la maturation (**Chae et al., 2004**), une situation qui pourrait s'expliquer par une activation fréquente par la S1P circulante, car on observe l'internalisation rapide du récepteur, avant son recyclage, après fixation de la S1P (**Liu et al., 1999**). Par contre, le récepteur est exprimé dans des modèles expérimentaux de greffe, et son inactivation par interférence ARN supprime la croissance tumorale chez la souris (**Chae et al., 2004**).

L'autre action spectaculaire de la S1P est le recrutement des lymphocytes hors des organes lymphoïdes et du thymus, suivant le gradient de S1P (**Mandala et al., 2002**). La convergence fonctionnelle entre les deux systèmes régulés par la S1P est d'ailleurs frappante : le système S1P/EDG apparaît chez les vertébrés, permettant à la fois le renforcement d'un système vasculaire clos et la migration des cellules du système immunitaire dans cet espace, grâce au gradient de concentration maintenu entre le sang et les tissus environnants (**Hla et al., 2008**).

L'expression fréquente de la sphingosine kinase dans les tumeurs, ou du récepteur EDG dans les vaisseaux tumoraux ont poussé au développement d'approches visant à inhiber l'enzyme, à bloquer

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

la S1P au moyen d'un anticorps (**Visentin et al., 2006**) ou à induire la baisse d'expression des EDG (développement du FTY720). Toutefois, si le rôle physiologique de la S1P commence à être relativement bien connu, et si des stratégies visent à entraver l'axe S1P/EDG dans des conditions pathologiques, peu de travaux ont tenté d'utiliser la S1P comme agent pharmacologique.

Ce rôle de « médiateur lipidique » de la S1P, passant par des récepteurs spécifiques, interroge la validité de l'identité posée initialement entre S1P exogène et intracellulaire. L'existence d'effets directs de la S1P extracellulaire repose sur plusieurs résultats :

La signalisation « inside/out » :

Comprendre l'action de la S1P extrinsèque suppose d'abord de s'intéresser aux mécanismes qui permettent à la S1P de franchir les membranes. La S1P est sécrétée par un nombre restreint de types cellulaires, qui ont servi de modèles à l'étude de son exportation : plaquettes avant tout (**Yatomi et al., 1995**) et astrocytes (**Bassi et al., 2006**). Dans ces trois cas, la S1P n'est libérée que sous l'effet d'un stimulus (respectivement : thrombine/collagène ou bFGF). Dans les plaquettes, on a donc la coexistence entre un stockage massif et un relargage contrôlé, qui passe par l'intervention d'un transporteur spécifique, prenant en charge la S1P accumulée sur le feuillet interne de la membrane plasmique. Ce transporteur a été identifié comme étant de type ABC (**Kobayashi et al., 2006**), et cette découverte a été étendue aux astrocytes (**Sato et al., 2007**).

Cette notion de transporteur de la S1P semble expliquer un modèle de signalisation, dit « inside/out », qui a constitué le prolongement des premiers travaux montrant l'activabilité de la sphingosine kinase par les récepteurs aux facteurs de croissance. Il s'avère en effet que dans certaines cellules, l'activation de récepteurs, par exemple les récepteurs FcεRI des mastocytes, conduit non seulement à l'activation de la sphingosine kinase mais aussi au relargage de la S1P hors des cellules (**Jolly et al., 2004**), une sécrétion qui coïncide plutôt bien avec la présence d'un transporteur ABC dans ces mêmes cellules (**Mitra et al., 2006**). Pourtant, les travaux montrant véritablement la mise en place d'une signalisation inside/out, c'est-à-dire au cours de laquelle l'activation de la sphingosine kinase conduit à la libération de S1P et à la réactivation de récepteurs EDG en surface des cellules, ont été obtenus sur des fibroblastes et des cellules HEK, c'est à dire des cellules pas spécialement considérées comme sécrétrices : on y observe que sans EDG, les HEK293 sont incapables de répondre au stimulus migratoire induit par le PDGF (**Hobson et al., 2001**), via une translocation massive de la sphingosine kinase dans le lamellipode marquant l'avant de la cellule (**Rosenfeldt et al., 2001**).

On a donc d'un côté la présence de transporteurs permettant le franchissement de la membrane dans les cellules produisant la S1P, et de l'autre des cas d'activation localisée de la sphingosine kinase qui semble suffisante pour que la S1P soit relarguée dans le milieu. Entre ces deux modèles, il est difficile de savoir dans quelle mesure la S1P franchit les membranes librement : l'inactivation individuelle des transporteurs ABC ne conduit pas à une modulation des niveaux de S1P plasmatiques, mais l'existence de sources alternatives de S1P complique l'interprétation de ces résultats (**Hla et al., 2008**). Par contre, sa suppression chez le poisson-zèbre conduit au même phénotype que l'inactivation du récepteur (**Kawahara et al., 2009**), de même qu'aucune S1P n'est libérée hors des cellules endothéliales (**Ancellin et al., 2002**). Le modèle de signalisation inside/out reste donc très largement à éclaircir, d'autant plus que certains modèles n'excluent pas un flip des molécules de S1P (**Hla et al., 2008**), et que l'interaction entre S1P et EDG reste à détailler.

L'action pharmacologique directe de la S1P :

Le mode d'action de la S1P extracellulaire est d'autant plus important que la découverte des récepteurs EDG a conduit à une réévaluation du concept de rhéostat S1P/céramide : l'équipe de

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

Spiegel a ainsi réalisé une étude pour montrer qu'une partie des actions de la S1P ne pouvaient être attribuées à une interaction avec les récepteurs EDG-1 (concentrations efficaces plus élevées que celles requises pour interagir avec le récepteur, internalisation de la S1P, action reproductible par microinjection directe de la S1P), et devaient donc bien passer par une action directe de la S1P en intracellulaire (**Van Brocklyn et al., 1998**). Ces résultats entrent en résonance avec ceux obtenus en utilisant la S1P pour protéger les oocytes des dommages provoqués par les radiothérapies : l'injection de la S1P protège les oocytes, permettant un maintien des capacités de gestation des souris ayant subi l'irradiation. In vitro, ces résultats semblent montrer que cette action ne passe pas par les récepteurs couplés aux protéines Gi (la toxine pertussique ne lève pas la protection conférée par la S1P) (**Morita et al., 2000**).

On voit donc qu'un double enjeu existe dans l'étude des propriétés de la S1P : ses propriétés de modulation pharmacologique peuvent-elles être étendues à d'autres modèles, avec si possible une validation précliniques ? De tels modèles peuvent-ils apporter un éclairage nouveau à certains aspects du modèle du rhéostat céramide/S1P ?

### 3. La voie apoptotique du céramide dans l'endothélium

L'endothélium comme cible critique du couple ASM/céramide :

L'un des modèles les plus féconds impliquant le céramide est l'endothélium soumis à l'irradiation forte dose. Comme nous l'avons évoqué précédemment, en 1994, des premiers travaux confirment des observations histologiques remontant au début des années 80, et prouvent que les cellules endothéliales irradiées s'engagent dans un processus apoptotique, une « mort interphasique » distincte de la mort clonogénique classiquement entraînée par les radiations et apparemment également disjointe de tout mécanisme déclenché par les dommages à l'ADN (**Fuks et al., 1994**). En utilisant des préparations membranaires de cellules endothéliales, à l'instar des premiers travaux dans les cellules leucémiques, l'équipe de Kolesnick montre que l'irradiation déclenche une génération de céramide par clivage de la sphingomyéline, une voie qui est donc totalement découplée de toute signalisation nucléaire (**Haimovitz-Friedman et al., 1994**). Les deux axes de recherche, réponse de l'endothélium à l'irradiation haute dose, et voie du céramide pro-apoptotique, se rejoignent donc.

Ils vont connaître une résonance particulière grâce à la génération en 1995 des souris invalidées génétiquement pour la sphingomyélinase acide (**Horinouchi et al., 1995**). Outre leur rôle crucial dans l'étude du syndrome de Niemann-Pick, ces souris vont permettre de définir la place de la sphingomyélinase dans la réponse au stress in vivo : dès 1996, les premiers résultats montrent que, lors d'une irradiation localisée des poumons, on peut mesurer une génération de céramide dans les organes, et que cette génération est abolie dans les souris KO. Mais surtout, l'irradiation déclenche une vague d'apoptose dans l'endothélium pulmonaire, qui est abolie par l'invalidation génétique de la sphingomyélinase acide (**Santana et al., 1996**). Des résultats similaires seront obtenus avec d'autres structures irradiées à forte dose, le cerveau (**Pena et al., 2000**) ou la barrière vaisseau sanguin/moelle épinière (**Li et al., 2003**).

Mais c'est avec le modèle du syndrome gastro-intestinal que l'invalidation génétique de la sphingomyélinase acide ne va plus seulement protéger l'endothélium de l'apoptose radioinduite, mais, ce faisant, empêcher également une défaillance de l'organe dans son ensemble (**Paris et al., 2001**). C'est en utilisant ce modèle séquentiel d'une défaillance tissulaire couplée à l'apoptose



## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

endothéliale que les résultats initialement cantonnés à des phénomènes affectant les tissus sains vont être extrapolés dans des tumeurs implantées chez la souris : on observe à nouveau que pour une irradiation à dose unique suffisamment élevée (15 Gy), on engage l'apoptose des vaisseaux tumoraux, et la régression tumorale, des mécanismes abrogés lorsque les greffes sont effectuées dans les souris KO (**Garcia-Barros et al., 2003**).

Le dernier modèle in vivo montrant la place du couple ASM/céramide dans la mort de l'endothélium est le choc septique induit par l'injection de LPS : celui-ci entraîne une réaction inflammatoire, avec libération massive de TNF, qui va provoquer des lésions à différents organes. On observe une génération de céramide rapide dans la muqueuse intestinale et les poumons, abrogée par un anticorps bloquant le TNF, et une mort de l'endothélium microvasculaire. L'inactivation génétique de la sphingomyélinase acide protège plus de 80% des animaux de la mort induite par le choc septique (**Haimovitz-Friedman et al., 1997**).

Les relais moléculaires du céramide dans l'endothélium :

Les modèles murins ont permis de montrer l'intervention majeure du couple sphingomyélinase acide / céramide dans la mort radioinduite de l'endothélium. Ils posent la question des voies moléculaires relayant l'action du céramide dans les cellules microvasculaires, et aboutissant au déclenchement d'une voie apoptotique impliquant vraisemblablement Bax et Bak.

*Relais du signal apoptotique par la voie des SAPK/ « kinases activées par le stress » dans les cellules endothéliales irradiées :*

Une publication princeps de l'équipe de Kolesnick a contribué à placer la voie des SAPK au centre des relais potentiels du céramide dans l'endothélium. Utilisant les cellules de macrovaisseaux BAEC, cette étude révèle qu'un certain nombre de signaux de stress, incluant l'irradiation à 10 Gy, déclenche une génération très rapide de céramide accompagnée du clivage concomitant de la sphingomyéline, sur des temps très courts (de l'ordre de la minute). Cette génération du céramide (mimée par l'ajout de sphingomyélinase bactérienne ou de céramide synthétique) entraîne l'activation de la voie des SAPK (cf. ci-dessous), caractérisée par la phosphorylation du facteur de transcription c-Jun. L'utilisation d'un dominant négatif de SEK1, activateur amont de la voie, protège les cellules de l'apoptose (**Verheij et al., 1996**).

Ces travaux ont été prolongés plus récemment par une étude de l'équipe de Polverini, qui montre qu'une dose unique d'irradiation (10 Gy) provoque l'activation rapide (dès 10 minutes) et prolongée (au-delà de 2 heures) de la voie p38, dont l'inhibition pharmacologique ou génétique empêche le déclenchement de l'apoptose radioinduite dans les cellules primaires de microvaisseaux HDMECs (**Kumar et al., 2004**).

Les deux études convergent car SEK1 est partagé entre les voies SAPK et p38, et que l'étude du groupe Polverini montre effectivement une coopération entre les deux voies, même si dans les cellules microvasculaires la place centrale dans le relais du signal apoptotique radioinduit semble occupée par p38.

*Organisation de la voie p38 :*

Découverte de la voie

# Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

Publications princeps :

Le champ des MAPK s'est historiquement structuré à partir de l'exploration de la voie des MAPK « classiques », une voie de réponse aux facteurs de croissance (insuline, PDGF, EGF, FGF ...) Mais l'identification d'une voie parallèle aux MAPK classiques (**Kyriakis et al., 1994**) va considérablement modifier cette vision : cette nouvelle voie est essentiellement activée par les stress environnementaux ou les cytokines pro-inflammatoires de la famille du TNF (TNF, IL-1, CD40, CD27...) et non par les facteurs de croissance (**Kyriakis et al., 1996**), et aboutit à la phosphorylation, entre autres, du facteur de transcription c-Jun (**Dérijard et al., 1994**), d'où la double dénomination de la voie : SAPK (Stress Activated Protein Kinase) et Jnk (Jun kinase).

Très peu de temps après la découverte de cette seconde voie MAPK, les approches biologiques spécifiques de quatre équipes convergent vers la découverte d'une troisième famille de MAPK chez les Mammifères :

Un polypeptide de 38 kDa est phosphorylé dans les monocytes murins exposés au LPS bactérien ou à un choc osmotique (**Han et al., 1994**)

Un polypeptide (« CBBP ») semble être la cible d'une classe de molécules anti-inflammatoires, les pyridinyl-imidazole (dont le plus étudié est le SB203580) qui inhibent la production de cytokines inflammatoires (IL-1, TNF- $\alpha$ ) dans les monocytes et les macrophages humains exposés au LPS (**Lee et al., 1994**)

Une kinase activée par le stress (**Rouse et al., 1994**) ou l'IL-1 (**Freshney et al., 1994**) et phosphorylant HSP27 via une kinase intermédiaire désignée comme MK2 est isolée.

L'expression de p38 s'avère ensuite dépasser largement le système hématopoïétique, cadre de sa découverte, pour toucher tous les tissus. La voie p38 semble une voie de réponse générale aux stress, conformément à l'homologie entre p38 et HOG, la voie de réponse au stress osmotique chez la levure (**Kyriakis et Avruch, 1996** et **Nebreda et Porras, 2000**). P38 semble largement conservé à travers le règne animal : la forme humaine présente 99% d'homologie avec la forme murine, 89% avec la forme (mkp2) présente chez le Xénope, et 52% avec le HOG de la Levure (**Mielke et Herdegen, 2000**).

Extension de la famille p38 :

Des approches de clonage vont permettre d'identifier trois autres gènes homologues au premier membre identifié de la famille, p38 $\alpha$ . P38 $\alpha$  et p38 $\beta$ , qui présentent 75% d'homologie, sont exprimés dans la plupart des tissus, tandis que les isoformes  $\delta$  et  $\gamma$ , qui ne présentent qu'environ 60% d'homologie avec  $\alpha$  (**Cuenda et Rousseau, 2007**) ont un profil d'expression plus restreint (peau, intestin grêle, rein) (**Mudgett et al., 2000**).

Organisation modulaire de la voie p38

Les MAPK s'organisent selon des modules de trois molécules reliées par une cascade de phosphorylation :

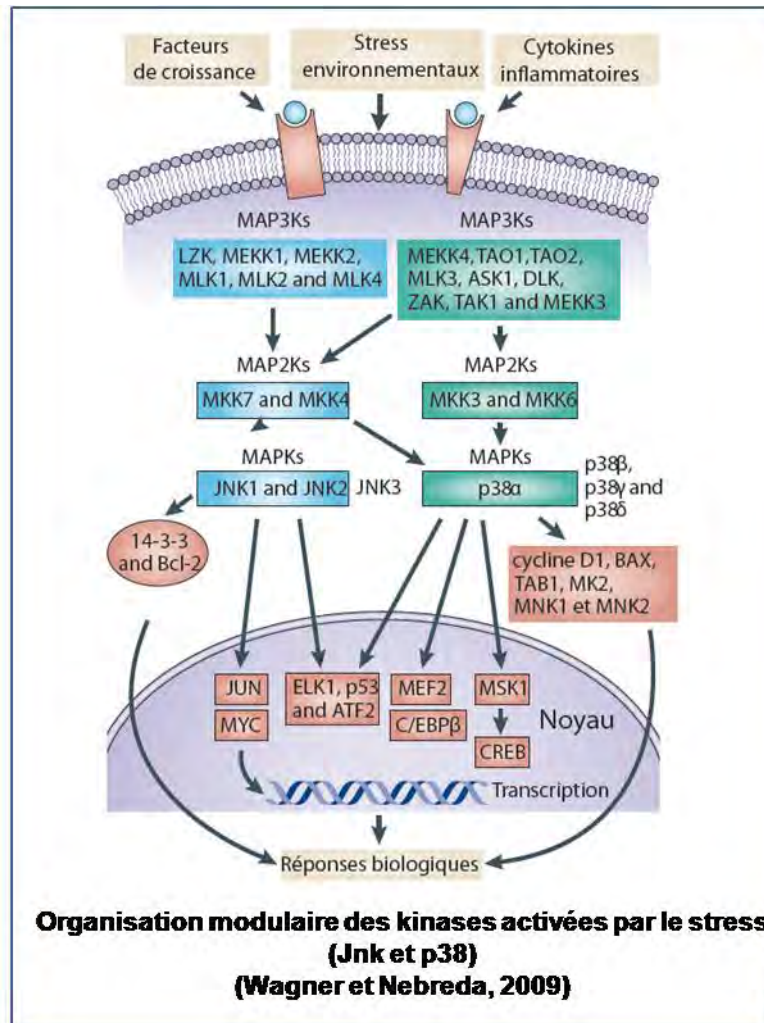
Les « MAP3K » constituent le premier élément du module. Elles sont multiples, activées par des signaux très variés, et phosphorylant les MAP2K sur des résidus sérine et thréonine (**Kyriakis et Avruch, 2001**)

Les MAP2K, en nombre plus limité, relaient le signal en phosphorylant les MAPK sur un motif thréonine/x/tyrosine, conservé au sein du sous-domaine VIII, dit boucle d'activation.

Les MAPK, une fois activées, vont phosphoryler un grand nombre de cibles allant des kinases à des facteurs de transcription.

# Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

Cette organisation modulaire a été décryptée, naturellement, d'abord via la voie des MAPK classiques : les récepteurs aux facteurs de croissance recrutent au niveau de la membrane plasmique des protéines adaptatrices et des facteurs d'échanges, aboutissant à l'activation de la petite protéine G Ras. Ras active alors une sérine-thréonine kinase, Raf (MAP3K), qui active MEF (MAP2K) et finalement active Erk (MAPK). Erk subit alors une translocation au noyau, où il transactive différents facteurs de transcription, modifiant l'expression génique de la cellule en faveur de la croissance cellulaire et de la prolifération, parfois la différenciation (Tibbles et Woodgett, 1999).



Les MAP3K liées à p38

Trois catégories de MAP3K interviennent dans la régulation de l'activité de p38 :

Les kinases MEK

Caractérisées par un domaine catalytique homologue à celui présent dans la MAP3K de *S.cerevisiae*, Ste11, qui contrôle à la fois la voie de et la voie de réponse au stress osmotique, trois MEK kinases sont considérées aujourd'hui comme des MAP3K de la voie p38 :

- MEKK4 : identifiée par son homologie avec Ste11 (Gerwins *et al.*, 1997) ou sa capacité à compléter la voie Hog chez la Levure (Takekawa *et al.*, 1997), elle serait partagée entre Jnk et p38 (Brancho *et al.*, 2003)

- TAK1 : A nouveau issue d'un criblage pour trouver de nouvelles MAP3K, en utilisant des levures déficientes pour la voie Ste11 mais à la voie HOG modifiée pour amoindrir la spécificité de ses

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

activateurs amont (**Yamaguchi et al., 1995**), cette MAP3K est capable (au moins in vitro) d'activer Jnk et p38, via MKK 3,4 et 6.

- ASK1 : Identifiée par des stratégies de PCR dégénérées ciblant les domaines caractéristiques des sérines/thréonines kinase, ASK1 est elle aussi capable d'activer conjointement Jnk et p38 via MKK 3, 4 et 6 (**Ichijo et al., 1997**)

- Les MLK (Mixed lineage kinases)

Les kinases TAO (thousand and one): Identifiée par homologie avec une kinase modulant Ste11, cette MAP3K semble capable d'activer MKK 3, 4 et 6 in vitro et plutôt MKK3 in vivo (**Hutchinson et al., 1998**).

Dans la voie des MAPK classiques, l'intervention de Ras a servi à définir le paradigme de l'activation des MAP3K : fixation de la MAP3K à une protéine activatrice aval (Ras), s'accompagnant de sa translocation à la membrane, de sa phosphorylation et de son oligomérisation. Un tel degré de connaissance n'est pas encore atteint dans le cas de la voie p38, dont l'intervention se limite pour l'instant à quelques voies, notamment :

La voie du TNFR : le TNF se fixe sur le TNFR, qui s'oligomérisent et est relayé par les protéines TRADD (Hsu, 1995), puis TRAF2. Celle-ci entraînerait une génération d'espèces radicalaires, provoquant la libération de la thiorédoxine d'Ask-1, qui alors s'oligomérisent, s'autophosphorylent et s'active (**Ichijo et al., 1997 ; Saitoh et al., 1998 ; Liu et al., 2000 et Mc Cubrey et al., 2006**).

La voie de l'IL1 : l'IL1 récepteur transduit le signal via les protéines adaptatrices MyD88, IRAK, et enfin TRAF6, qui active TAK1 (**Kyriakis et Avruch, 2001**)

Sur le modèle des MAPK classiques, l'implication des petites protéines G dans la régulation des MAP3K de la voie p38 a été privilégiée, mais sans dégager de connexions aussi fortes que la voie Ras/Raf : cdc42 et Rac semblent capables, via PAK, d'activer MLK1 à 3, qui possèdent un domaine CRIB (**Nagata et al., 1998**). L'étude du couplage entre RCPG et voie p38 reste, elle aussi, balbutiante.

Les MAP3K constituent l'un des terrains d'étude des protéines « scaffold », des protéines structurales organisant les voies de transduction en provoquant l'interaction entre différents membres d'une même voie de transduction. De telles protéines organisent effectivement les voies homologues des MAPK chez la Levure : Ste11p organise la voie Hog (**Posas et Saito, 1997**), et Ste5 les programmes gouvernant la fécondation (**Elion, 2001**). L'opérativité du concept dans les cellules de mammifères a été démontrée en exprimant des protéines scaffold artificielles (**Harris et al., 2001 et Park et al., 2003**). Un certain nombre de protéines scaffold stricto sensu, ou de membres de la voie des MAPK possédant la double fonction a été découvert, organisant la voie des MAPK classiques (KSR par exemple), et Jnk (SRKP1, notamment). Par contre, seules les protéines scaffold Jip2 et 4, initialement découvertes dans des études portant sur l'organisation de la voie Jnk, sont pour l'instant suspectées de jouer un rôle architectural dans la voie p38, et les preuves ont principalement été obtenues in vitro. Plus récemment est venue s'y adjoindre OSM, susceptible de réguler p38 $\alpha$  dans des conditions de stress osmotique (**Uhlik et al., 2003**). La caractérisation des complexes moléculaires comprenant des protéines scaffold dans des conditions physiologiques, les mécanismes par lesquels ces protéines modulent les kinases, notamment en termes de localisation, constituent des enjeux importants pour le décryptage des voies MAPK (**Morrisson et Davis, 2003**).

Les MAP3K forment donc un groupe très étendu (Obata, CCM, 2000), dont la complexité s'explique : Par les approches utilisées pour leur découverte : elles ont été découvertes récemment, en utilisant essentiellement des approches biochimiques et cellulaires (surexpression, invalidation génétique, essais de phosphorylation in vitro), mais très peu de raffinements de ces résultats par des modèles

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

d'animaux KO (**Davis, 2000** et **Weston et Davis, 2007**). Leur très forte activité basale représente un obstacle supplémentaire à leur étude (**Avruch et Kyriakis, 2001**)

Peut être par les fonctions qu'elles remplissent hors des MAPK, sur le modèle de Raf, capable d'une action directe sur Ask-1 (**Chen et al., 2001**), ou bien parce que leur multiplicité reflète la multiplicité des signaux activateurs des MAPK (**Ichijo, 1999**).

Les MAP2K liées à p38

Trois kinases sont considérées comme les MAP2K de la voie p38 :

MKK3 a été clonée chez la levure par homologie avec MEK, la MAP2K des la voie des MAPK classiques (**Dérijard et al., 1995**), puis a elle-même servi au clonage par homologie de MKK6 (**Stein et al., 1996**). Les deux MAP2K s'avèrent constituer des activateurs spécifiques de p38, sans effet sur la voie Erk ou Jnk (**Raingeaud et al., 1996**), une spécificité reposant sur la double reconnaissance d'un domaine de la partie N-terminale de p38, et de la boucle d'activation de cette dernière (**Enslin et al., 2000**). MKK3 active les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  de p38 alors que MKK6 est capable d'en activer toutes les isoformes. A la différence des MAP2K décrits dans la voie des MAPK classiques, strictement cytoplasmiques, ces deux MAP2K semblent capables d'adopter une localisation cytoplasmique comme nucléaire.

MKK4 (SEK1) a été identifiée initialement lors d'un criblage de nouvelles MAP2K, chez le Xénope, puis la souris et enfin l'homme. Cette MAP2K est capable d'activer Jnk, et n'était pas considérée comme intervenant dans la voie p38, notamment en raison de résultats négatifs obtenus chez la Drosophile (**Han et al., 1998**), jusqu'à la génération de souris doublement invalidées pour MKK3 et 6, dont les fibroblastes embryonnaires restent le siège d'une activation de p38 par les UV, supprimée si on invalide MKK4 par siRNA (**Brancho et al., 2003**). MKK4 possède donc la propriété unique parmi les MAP2K de phosphoryler et d'activer deux groupes de MAPK.

*La kinase p38*

Principes d'action de p38

P38 est activée par une double phosphorylation sur un motif caractéristique thréonine/glycine/tyrosine. Le modèle déduit des travaux structuraux sur p38 $\delta$  est qu'elle subit alors un changement de conformation, qui altère l'alignement de ses deux demi-domaines kinases, permettant un accès facilité du substrat, deux mécanismes qui sont considérés comme augmentant son activité kinase (**Bellon et al., 1999**).

Un site de fixation de l'ATP très spécifique a également été mis en évidence. Il serait à la base de la spécificité de l'inhibition par les triaryl-imidazole, comme le démontrent à la fois les études de cristallographie et les approches de mutagenèse dirigée : la séquence thréonine (106)- histidine (107) –leucine (108), introduite dans les isoformes  $\delta$  et  $\gamma$ , voire dans Jnk1, confère la sensibilité à cette classe d'inhibiteurs à la base spécifiques de p38 (**Gum et al., 1998**).

Les MAPK p38 sont qualifiées de « proline-directed kinases », kinases à la spécificité contrôlée par un résidu proline : elles ne phosphorylent des séquences Sérine/Thréonine que si celles-ci sont suivies immédiatement d'une proline (**Obata et al., 2000**). Mais cette séquence n'est pas suffisante, et est complétée par des domaines d'ancrage (docking) spécifiques, notamment une courte séquence de résidus basiques retrouvée dans de nombreuses cibles de p38 (MNK, MK2/3, PRAK) et désignée par le terme Common Docking Domain (**Tanoue et al., 2000**).

Récemment, plusieurs études ont convergé vers un mécanisme d'activation de p38 inconnu jusqu'alors chez les MAPK : il semble notamment que dans les lymphocytes T, l'activation de p38

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

n'emprunte pas la cascade MAP3K/MAP2K, mais passe par une interaction entre p38 et une protéine scaffold, TAB-1 (identifiée par double hybride justement par ses capacités d'interaction avec p38), ce qui conduit à l'autophosphorylation de la MAPK (**Ge et al., 2002**). L'intervention d'un tel mécanisme est suspectée dans deux autres systèmes : les cellules dendritiques (**Matsuyama et al., 2003**), et les cardiomyocytes (**Tanno et al., 2003**). Son impact sur les effecteurs pourrait être très distinct de celui d'une activation de la voie p38 classique (**Cuenda et Rousseau, 2007**).

La localisation de p38 reste mal comprise : le dogme établi par l'étude d'Erk est une translocation massive de cette MAPK du cytoplasme vers le noyau après activation (**Chen et al., 1992**). Cette translocation nucléaire coïncide avec l'activation, par la voie p38, de l'expression génique (**Brunet et al., 1999**). Le mécanisme contrôlant cette relocalisation n'est pour autant pas totalement élucidé : Erk est dépourvu de séquence de localisation nucléaire, et on sait juste qu'après phosphorylation par MEK, il s'en dissocie avant une relocalisation active au noyau (**Fukuda et al., 1997**). Mais ce mécanisme n'a pu être clairement établi pour p38, qui semble présent à la fois au noyau et dans le cytoplasme, des travaux rapportant une relocalisation nucléaire suivant son activation sur le modèle d'Erk (**Raingaud et al., 1996**) et d'autres indiquant au contraire une exportation hors du noyau par une des ses cibles, MK2 (**Ben-Levy et al., 1998**).

### Des fonctions et des cibles diversifiées

Dans de nombreuses voies de signalisation, mais tout particulièrement chez les MAPK, on observe, après la découverte initiale de la voie (en général associé à quelques fonctions cellulaires bien délimitées), une explosion de résultats, souvent obtenus sur des lignées cellulaires, montrant à la fois l'implication de la voie dans de nouveaux contextes et l'existence de nombreuses cibles moléculaires de cette voie. Une telle dynamique est clairement visible dans les études concernant la voie p38.

Le nombre de cibles de p38 s'est considérablement étendu depuis leur découverte en 1994. Les principales sont :

Des sérine/thréonine kinases :

- MK2 (MAPKAPK2), qui est le premier substrat identifié de p38 (**Stokoe et al., 1992 et Rouse et al., 1994**). Elle phosphoryle HSP27 (**Landry et Huot, 1995**), ce qui entraîne la dépolymérisation de cette dernière et sa redistribution sur le cytosquelette d'actine (**Huot et al., 1997**). Elle régule également la stabilité de certains ARNm.

- PRAK (p38-regulated/activated proteine kinase), qui phosphoryle HSP27 (**New et al., 1998**).

- MNK1, qui fût d'abord identifiée en double hybride comme interagissant avec Erk2 (**Waskiewicz et al., 1997**), est une cible commune des voies Erk et p38 (**Fukunaga et Hunter, 1997**). Elle module l'initiation de la transcription en phosphorylant eIF-4<sup>E</sup> (**Waskiewicz et al., 1999**), et possède la particularité d'avoir une localisation fluctuant entre le noyau et le cytoplasme grâce à la double présence d'une séquence de localisation et d'exportation nucléaire.

- MSK1 et 2, identifiés, eux aussi par double hybride, comme interagissant avec p38 (**Pierrat et al., 1998**). Ils phosphorylent les facteurs de transcription ATF1 et CREB (**Lee et al., 2000**), mais aussi l'histone H3 et HMG14, modulant ainsi le remodelage chromatinien (**Soloaga et al., 2003**). Les deux kinases, qui possèdent une séquence de localisation nucléaire (**Pierrat et al., 1998**), peuvent être transloqués vers le cytoplasme lors de l'activation par p38 (**Richards et al., 2001**).

Des facteurs de transcription :

- ATF2, qui est le premier facteur de transcription identifié comme une cible de p38 et de Jnk (**Derijard et al., 1994 et Gupta et al., 1995**). Sa phosphorylation augmente son activité transcriptionnelle (**Raingaud et al., 1995**), ATF2, comme les facteurs de transcription Fos (que p38 induit via Sop1-a), forme avec les facteurs de transcription de la famille bZip des hétérodimères AP-1,

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

qui se fixent sur les « éléments de réponse TPA », des séquences régulatrices situées dans les promoteurs de nombreux gènes (**Van Dam et al., 1995**).

- MEF2A/C, NFAT, CHOP, Max sont autant d'autres cibles de p38 capables de réguler la transcription de certains gènes (**Kyriakis et Avruch, 2001**)

P38 a été mis en évidence, lors de sa découverte, dans le contexte de la réponse générale au stress et en particulier l'inflammation. Ceci conjugué aux potentialités thérapeutiques, explique l'abondance de résultats connectant p38 à l'inflammation (et par extension au système immunitaire de façon large) (**Ono et Han, 2000**) : production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6 et IL8), d'enzymes comme COX-2 ou iNOS, de protéines d'adhérence comme ICAM, le spectre d'intervention de p38 semble couvrir tous les pans de la réponse inflammatoire. TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  et IL6 sont des acteurs clés des pathologies de type arthrite rhumatoïde et maladie de Crohn, et expliquent les nombreux développements d'inhibiteurs de p38 par l'industrie pharmacologique.

Son action sur l'expression du TNF via MK2 a particulièrement bien été démontrée : les souris dans lesquelles l'élément AU, qui assure une dégradation rapide de l'ARNm codant pour le TNF, est invalidé surexpriment ce dernier et présentent les symptômes de graves maladies inflammatoires (arthrite inflammatoire chronique, maladie de Crohn, etc.). Leurs macrophages deviennent insensibles aux inhibiteurs de la voie p38 (**Kontoyannis et al., 1999**). Les souris invalidées pour MK2 sont résistantes au choc septique induit par l'injection de LPS, via une réduction de la traduction des ARNm du TNF (**Kotlyarov et al., 1999**). Ces résultats démontrent que la voie p38 induit une stabilisation du TNF via MK2.

Cette implication de p38 dans la modulation des réponses inflammatoires s'étend aussi aux cellules endothéliales (**Hoefen et Berk, 2002**), dans lesquelles p38 régule l'expression de la E-sélectine (dont le promoteur contient un site de fixation pour les hétérodimères AP1 ATF2/c-Jun) (**Read et al., 1997**), de MCP-1 (**Goebeler et al., 1999**) et de VCAM-1 (cette fois la régulation est post-transcriptionnelle) (**Pietersma et al., 1997**), notamment.

Ensuite, l'impact de p38 dans un grand nombre d'autres domaines a été étudié dans des types cellulaires plus restreints :

- Différenciation :

P38 intervient dans la conversion des myoblastes en myotubes différenciés, au cours de la myogenèse. Cette régulation de la différenciation, confirmée par l'incapacité des myoblastes issus de souris déficientes pour p38 à se différencier, passerait par une intervention de p38 à de multiples niveaux : phosphorylation de facteurs de transcription de la famille MEF2, de E47 (qui module la structure de la chromatine), et enfin stabilisation de certains ARNm via KRSP (**Cuenda et Rousseau, 2007**)

- Migration cellulaire :

Après une première mise en évidence de l'intervention de p38 dans la migration des cellules endothéliales (**Rousseau et al., 1997**), ces résultats ont été étendus à des types cellulaires variés (neutrophiles, cellules musculaires lisses, mastocytes, neurones, cellules épithéliales...), et de nombreux relais moléculaires à p38 sont envisagés (HSP27, LIMK1, MMP, caldesmone,...) (**Cuenda et Rousseau, 2007**).

- Réponse adaptative :

P38 semble intervenir en particulier dans les réponses adaptatives du système cardio-vasculaire : dans l'hypertrophie cardiaque résultant de l'hypertension, ou dans l'apoptose et la nécrose des cardiomyocytes lors des accidents ischémiques (même si les approches de surexpression et le rôle des différentes isoformes (**Wang et al., 1998**) restent très largement débattus (**Clerk et Sugden,**

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

2006). On suspecte qu'elle soit également impliquée dans la détoxification du foie, ou encore dans le transport de l'inositol dans le rein soumis à une hyperosmolarité (**Tibbles et Woodgett, 1999**).

Prémises d'une rationalisation des fonctions par les modèles d'invalidation génétiques

L'avènement des souris KO a permis d'aboutir, pour un certain nombre de voies de transductions, à la clarification dans la multitude de rôles mis en évidence dans les lignées cellulaires. Mais cette rationalisation n'est pas achevée pour p38 :

Les quatre isoformes de p38 ont été invalidées : la déficience en p38 $\alpha$  est létale, car il semble requis dans le développement normal du placenta, et son absence entraîne la suffocation et la déprivation des embryons (**Adams et al., 2000**). Mais si on contourne cette létalité extraembryonnaire par une fusion entre blastocystes, l'embryon est viable (même si d'autres résultats indiquent un défaut d'hématopoïèse fœtale qui entraînerait la mort des animaux nouveau-nés (**Tamura et al., 2000**), ce qui semble indiquer une redondance fonctionnelle entre p38 $\alpha$  et les autres isoformes (**Bradham et Mc Clay, 2006**), tout comme l'invalidation individuelle des trois autres isoformes n'entraîne pas de modification évidente du phénotype. Des modèles récents d'invalidation conditionnelle

Les modèles les plus poussés à ce jour, reposant sur des invalidations conditionnelles chez la souris, ont également permis de contourner cette létalité embryonnaire. Ils ont confirmé certaines modalités d'intervention de p38 dans la tumorigénèse, en induisant un état différencié des progéniteurs pulmonaires (**Ventura et al., 2007**, Cre-Lox avec expression généralisée de la recombinaison sous tamoxifène) ou en limitant l'impact d'un état d'inflammation chronique dans un modèle de carcinogénèse hépatique (**Sakurai et al., 2008**, Cre-Lox avec expression de la recombinaison limitée aux macrophages). Bien que le rôle de p38 dans ce dernier cas soit assez particulier (il y intervient en limitant l'impact des espèces radicalaires dans les hépatocytes, et également en limitant la cascade pro-inflammatoire relayée par les cellules de Kupfer qui amplifie la prolifération hépatocytaire), il montre l'impact majeur de tels modèles murins sur notre compréhension de la voie.

L'invalidation d'un activateur de p38 (MKK3 ; **Lu et al., 1999**) ou d'une cible majeure de p38 (MK2, **Kotlyarov et al., 1999**) n'affecte pas la viabilité des animaux, soulignant les nuances qui peuvent exister dans l'activation de la voie p38, même si le KO MKK3 a démontré une nouvelle fois l'importance de p38 dans la voie pro-inflammatoire.

Modulation du cycle cellulaire et de l'apoptose par p38 :

Deux fonctions sont particulièrement sensibles dans le cadre du rôle potentiel de p38 dans la réponse à l'irradiation à forte dose : le blocage en cycle et l'apoptose.

P38 a été impliqué dans le blocage du cycle cellulaire. Les premières preuves sont venues d'expériences basiques consistant à injecter MKK3, 6 ou p38 dans des cellules exposées au sérum : les 3 acteurs de la voie p38 bloquent alors la prolifération des cellules injectées (**Molnar et al., 1997**).

De même, chez les fibroblastes, le contact de cellules à cellules entraînerait une activation soutenue de p38, conduisant au blocage de cycle (**Faust et al., 2005**). Puis de nombreux travaux ont montré l'intervention de p38 en divers points du cycle cellulaire :

En G1/S : p38 bloquerait le cycle en G1/S, sous l'effet des rayonnements ultraviolets (**Bulavin et al., 1999**) et du choc osmotique (**Goloudina et al., 2003**). Une preuve supplémentaire est apportée par les fibroblastes doublement déficients en MKK3 et 6, qui sont insensibles à la déprivation en sérum et ne se bloquent pas en G1/S (**Brancho et al., 2003**). De nombreux relais ont été proposés : phosphorylation directe de Cdc25 par p38, ce qui provoque une interaction entre 14-3-3 et Cdc25, et



## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

la relocalisation de ce dernier hors du noyau, l'empêchant d'activer les CDK (**Bulavin et al., 1999**), inhibition de l'expression des cyclines A et D1 (**Casanovas et al., 2000**)

En G2/M : la surexpression de MKK3 ou 6 induit un blocage en G2M dans les fibroblastes (**Garner et al., 2002**), de même que MKK6 placé sous promoteur Lck, donc surexprimé dans les lymphocytes (**Diehl et al., 2000**). Cette action pourrait à nouveau être médiée par Cdc25, via MK2 (**Manke et al., 2005**), conformément au modèle de blocage du cycle établi dans la levure (**Lopez-Aviles et al., 2005**). MK2 constituerait lors une kinase essentielle dans le blocage des cellules en G2/M, complément nécessaire des voies ATM/Chk2 et ATR/Chk1 (**Abraham et al., 2005**).

Le parallèle entre p38 et Jnk est particulièrement éclairant en ce qui concerne leurs rôles respectifs dans la modulation de l'apoptose :

Tout comme Jnk, p38 a été connecté au contrôle de la mort cellulaire programmée peu après sa découverte. La publication séminale dans le domaine est même commune aux deux voies, montrant comment une culture de cellules neuronales différenciées PC12 bascule en mort cellulaire programmée si on leur retire le facteur trophique NGF, via une activation conjointe des voies p38 et Jnk. Le blocage des 2 voies au moyen de dominants négatifs prévient cette apoptose (**Xia et al., 1995**). De même, des fibroblastes embryonnaires murins invalidés pour la MAP3K Ask1 deviennent résistants à l'apoptose induits par le TNF et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, alors que le rétablissement d'Ask entraîne une signalisation Jnk et p38 et la mort des cellules (**Tobiome et al., 2001**). Le même type cellulaire, mais cette fois issu des animaux déficients en p38 $\alpha$ , devient résistant à la déprivation en sérum qui provoque l'apoptose dans les fibroblastes sauvages (**Porras et al., 2004**). Il existe donc des preuves tangibles du rôle de p38 comme voie apoptotique. Mais comme pour Jnk, l'implication de p38 dans le contrôle de la mort cellulaire programmée est une question complexe : en culture comme in vivo, on trouve une corrélation entre toxicité aiguë et phosphorylation de p38 (**Harper et Lograsso, 2001**) mais également des résultats totalement opposés (**Naya et al., 2002** et **Park et al., 2002**). Un problème identique avait déjà surgi lors de l'exploration de la fonction apoptotique de Jnk : ainsi, l'invalidation de Jnk3 a révélé son rôle pro-apoptotique dans une population neuronale (celle de l'hippocampe, dans un modèle d'excitotoxicité, **Yang et al., 1997**), tandis que Jnk1 et 2 jouaient au contraire un rôle protecteur (**Ip et Davis, 1998**). On retrouve donc pour p38 les mêmes données de base indiquant une implication variable dans la modulation de l'apoptose, sans pour autant posséder autant de données in vivo que pour Jnk, où apparait clairement une variabilité à l'échelle de sous-populations cellulaires, en fonction des isoformes de la MAPK, et suivant les stimuli.

Les études portant sur Jnk ont permis de délimiter deux types d'intervention dans l'apoptose : d'abord via son action transcriptionnelle (induction de c-Jun par exemple), mais également directe (notamment au niveau de la mitochondrie via les membres de la famille Bcl2). Le rôle de p38 est moins bien cerné, mais on peut cependant noter quelques grands principes :

La durée du signal est importante : la présence d'Ask1 notamment permet l'obtention de cinétiques d'activation de Jnk et p38 longues (prolongées au-delà de 45 minutes), associées à l'apoptose (**Tobiome et al., 2001**)

Si l'action pro-apoptotique de p38 peut être transcriptionnelle dans certains modèles (par exemple, via le facteur de transcription MEF2 dans les neurones, **Mao et al., 1999**), dans les cellules microvasculaires, son action semble directe, car elle peut être abolie en surexprimant Bcl2 (**Kumar et al., 2007**).

# Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

## *Intervention de p38 dans les tumeurs*

L'implication de p38 dans la modulation du cycle cellulaire et de la mort cellulaire programmée rend probable son intervention dans les mécanismes d'oncogenèse et de réponse des tumeurs aux thérapies anti-tumorales.

## Les modèles d'intervention de p38 dans l'oncogenèse

En tant que bloqueur de cycle et régulateur positif de l'apoptose, p38 possède le profil d'un frein à la transformation cellulaire, un résultat confirmé par trois séries de résultats :

Des fibroblastes doublement déficients en MKK3 et MKK6, stimulés par l'antigène T, possèdent, lorsqu'ils sont injectés dans des souris nude, un potentiel tumorigénique beaucoup plus fort que les fibroblastes sauvages (**Brancho et al., 2003**)

Lorsque l'on injecte la lignée Hep3 dans la membrane chorioallantoïque d'embryon de poulet ou dans des souris nude, on constate une activation importante mais transitoire de p38 marquant le déclenchement d'une croissance tumorale robuste accompagnée de métastases (**Aguire-Ghiso et al., 2004**).

L'inactivation de p38 dans le foie conduit à une tumorigénèse accrue quand on expose les animaux à un agent chimique carcinogène (**Hui et al., 2007**).

Plusieurs études ont expliqué cette intervention de p38 par le rôle qu'il joue dans la sénescence induite par les oncogènes, comme par exemple dans :

- les fibroblastes transformés par Ras. La voie p38 y semble activée via MKK3 et MKK6, et relayée par GADD45, bloquant la transformation (**Wang et al., 2002** et **Bulavin et al., 2003**)
- les cellules épithéliales transformées par ErbB2 (**Trost et al., 2005**)

La sénescence serait déclenchée par une cascade p38/PRAK menant au bloc « classique » p53/p16 (**Han et Sun, 2007**).

Une autre série de travaux s'est intéressée à l'action d'une phosphatase de p38, WIP1/PMID. La perte de cette enzyme supprime la transformation par H-Ras de fibroblastes embryonnaires murins, en déclenchant la voie p53 et la voie p16. Le modèle établi dans les cellules IM-R90 postule que sous l'effet du signal oncogénique provenant de Ras, le déclenchement de la voie p38 entraîne celui de p53, qui entraîne l'expression de WIP-1, ou le déclenchement de p16 (**Bulavin et al., 2002** et **2004**). Ce modèle a été renforcé en montrant que des fibroblastes transformés par E1A et Ras, injectés dans des souris nude, provoquent une tumorigénèse accélérée si l'animal est déficient en p38 ou s'il surexprime Wip-1 (**Bulavin et al., 2002**). En outre, Wip1 semble inactivé dans 11% des tumeurs primaires dans lesquelles p53 n'est pas muté. Enfin, de façon plus directe, les souris doublement déficientes pour Wip1 et BRCA2 présentent une tumorigénèse mammaire retardée, avec une forte activité tissulaire de p38 et p16. Ce gain est supprimé si on désactive p38 (ce qui s'accompagne d'une baisse de l'expression de p16), ou si on inactive le locus Cdkn2a directement (**Bulavin et al., 2004**). Réciproquement, l'expression ciblée de Wip1 dans l'épithélium mammaire accélère la tumorigénèse déclenchée par la surexpression d'ErbB2, sauf si la voie Mkk6/8 est suractivée.

Un troisième modèle a montré comment la fonction pro-apoptotique de p38 semble entraver la transformation de fibroblastes exposés à N-Ras : on y retrouve le frein exercé par p38 à la transformation par Ras constitutivement activé, disparaissant dans les fibroblastes issus des souris p38 $\alpha$ -/- . Mais il est cette fois expliqué par un mécanisme particulier : la transformation par Ras s'accompagne d'une production importante d'espèces radicalaires, qui s'accumulent dans le modèle sur trois ou quatre jours. Ces espèces activées contribueraient à l'acquisition du phénotype transformé, en induisant une instabilité génétique accrue par exemple. Or, ces mêmes espèces activeraient p38, en dissociant Ask-1 de protéines régulant cette dernière négativement. La voie p38 déclencherait alors la mort cellulaire des fibroblastes en cours de transformation (**Dolado et al.,**

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

**2007**). Dans ce modèle, p38 s'oppose donc spécifiquement aux oncogènes induisant la production de radicaux libres. Ce mécanisme pourrait expliquer pourquoi p38 régule la longévité des cellules souches hématopoïétiques murines, qui dépend du niveau d'espèces radicalaires présentes dans ces cellules (mais est totalement indépendant de p53/p16) (**Ito et al., 2006**). Pour autant, p38 ne possède pas en tant que tel un statut de suppresseur de tumeur, car il ne subit pas de diminution d'expression ou d'activité dans les tumeurs, peut être en raison de l'abondance de fonctions complexes dans lesquelles il est impliqué. Les modulations pourraient affecter les MAP3K ou les phosphatases. Une hypothèse alternative à ces divers modèles, essentiellement cellulaires, qui plaident en faveur d'une fonction anti-oncogénique classique de p38 a été récemment avancée au travers d'une étude d'inactivation de p38 restreinte aux poumons. P38 semble y réguler le ratio prolifération versus différenciation, en faveur de cette dernière, contrôlant ainsi la maturation des progéniteurs pulmonaires. Ce contrôle double aurait un impact direct sur la tumorigénèse : en l'absence de p38, l'accumulation de cellules immatures et hyperprolifératives conduirait à la formation accélérée d'adénocarcinomes (**Ventura et al., 2007**).

Les modèles d'intervention de p38 dans les tumeurs établies

En parallèle des travaux portant sur le rôle de p38 dans l'initiation des tumeurs, un certain nombre d'autres études se sont intéressées à la fonction jouée par p38 dans les tumeurs établies, en particulier dans le cadre de la réponse aux thérapies.

De nombreux travaux montrent la capacité de drogues anti-cancéreuses variées à induire la voie p38, essentiellement avec une conséquence apoptotique, dans diverses lignées tumorales (**Olson et Hallahan, 2004**) :

- Les cellules de médulloblastome (**Hallahan et al., 2003**) ou de carcinomes ovariens soumises à l'acide rétinoïque (**Holmes et al., 2003**).
- HeLa (**Deacon et al., 2003**) ou MCF7 (**Bacus et al., 2001**) exposées à des agents dépolymérisants des microtubules (nocodazole, vincristine et vinblastine) ou les stabilisant (taxol).
- Six lignées, en réponse au cisplatine (agent pontant de l'ADN) et à la doxorubicine (inhibiteur de la topoisomérase) (**Losa et al., 2003**), confirmant des résultats déjà centrés sur la cisplatine (**Zanke et al., 1996**).

Les travaux sur les mécanismes d'activation de p38 dans les tumeurs sont par contre beaucoup plus réduits, avec deux exceptions notables, toutes deux réalisées sur des modèles uniquement cellulaires :

Classiquement, les drogues inhibant la topoisomérase I (camptothécine) ou les agents pontants (cisplatine) déclenchent les voies ATM/Chk2 et ATR/Chk1 dans les cellules, provoquant leur blocage en cycle en G2/M, en plus de p53 qui via ATM, bloque le cycle en G1/S. Si on bloque cette dernière voie dans les fibroblastes embryonnaires murins, on assiste à un basculement du mécanisme de blocage cellulaire induit par ces drogues : on passe d'un blocage contrôlé par les voies ATM/p53 et ATR/Chk1 à un blocage passant par ATR/Chk1 et ATM/p38, ce qui active MK2 et phosphoryle Cdc25, bloquant les cellules en G2/M. Inhiber MK2 libère les cellules de ce blocage, et les conduit vers une mort mitotique. Ces résultats sont prolongés par l'injection de fibroblastes murins transfectés par une forme activée de Ras, et qui sont fortement sensibilisés aux trois drogues citées précédemment si l'on inhibe pharmacologiquement MK2. Ces résultats appuient donc le rôle de p38 dans l'inhibition du cycle, cette fois en réponse aux chimiothérapies, en faisant une véritable voie complémentaire à Chk1 et 2. Ils expliquent sûrement pour une large part l'induction fréquente de p38 par les drogues anti-cancéreuses dans différentes lignées évoquées au paragraphe précédent, mais soulignent aussi que le bon niveau d'action sur la voie se situe peut être en aval de p38 (**Reinhardt et al., 2007**)

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

Une étude portant sur les mécanismes de dépendance aux oncogènes a également apporté un nouvel éclairage sur le rôle que pourrait jouer p38 dans les tumeurs. La « dépendance aux oncogènes » désigne, nous l'avons vu, un phénomène par lequel certaines cellules cancéreuses ont besoin du maintien d'un oncogène précis pour leur survie. Les trois oncogènes utilisés dans l'étude sont Src, Bcr-Abl, et EGFR, et lorsqu'on les désactive, les voies de survie qui leur sont couplées (Stat, Akt par exemple) décroissent rapidement, mais cela s'accompagne d'une vague de phosphorylation de p38. L'ensemble des voies pro-survie serait sous le contrôle d'une phosphatase qui les inactiverait rapidement, si elles ne sont plus déclenchées par l'oncogène activé, tandis que le signal p38, émanant lui-même de l'oncogène, persiste plus longtemps. Ce différentiel entre désensibilisation des voies de survie et voie de mort semble entraîner les cellules vers l'apoptose. Aucun mécanisme n'est identifié dans l'étude, les résultats étant purement corrélatifs, mais ils définissent un nouveau mécanisme de mort en lien cette fois avec la dépendance aux oncogènes. Dans un tel cadre, les modèles prévalant définissent essentiellement la mort comme une voie « par défaut » dans les cellules tumorales, lorsque l'oncogène est désactivé, ce qui constitue la base théorique de l'action des thérapies ciblées de type gefatinib, alors qu'ici c'est l'oncogène lui-même que semble activer la voie de mort (**Sharma *et al.*, 2006**)

Ces différents modèles démontrent que p38 ne possède pas un statut unique dans le domaine de l'oncogénèse. Le statut de p38 comme bloqueur de cycle s'oppose à l'oncogénèse, ou au contraire favorise la résistance aux agents chimiothérapeutiques, tandis que son statut d'inducteur de l'apoptose le fait s'opposer à l'oncogénèse dépendante de Ras via les espèces radicalaires, et à provoquer la mort des lignées possédant une dépendance aux oncogènes Abl, Src et EGFR. Ces études soulignent la difficulté de moduler la voie p38, mais apportent également de nouveaux modes d'intervention de p38.

Le céramide, agent de remodelage membranaire:

L'accumulation des résultats montrant une génération de céramide sous l'effet de stimuli divers, et la forte implication du céramide dans l'apoptose ont conféré à ce dernier un statut de messenger secondaire, à l'instar des phospholipides ou du diacylglycérol. Les études pour le démontrer ont eu très largement recours aux céramides à courtes chaînes acyle, soluble dans l'eau et s'insérant facilement dans les membranes, mais ne correspondant pas au céramide naturel. Les propriétés d'un tel messenger secondaire sont en général :

- une production rapide et transitoire : le céramide généré lors de l'irradiation forte dose de l'endothélium répond à de tels critères
- des cibles physiologiques bien définies : la question est plus compliquée pour le céramide face, comme présentée auparavant, à l'abondance des cibles étudiées au niveau cellulaire.
- une interaction bien définie entre le messenger secondaire et sa cible : à nouveau, malgré certaines tentatives, il n'y a pas de consensus pour définir aujourd'hui avec précision un domaine d'interaction spécifique au céramide au sein de ses cibles cellulaires (**Van Blitterswijk *et al.*, 2003**).

Mais la propriété qui distingue le plus le céramide d'un messenger secondaire classique est sa très forte hydrophobicité : le céramide peut donc être considéré comme une molécule n'existant pas à l'état libre, c'est-à-dire hors des membranes cellulaires (**Venkatamaran et Futerman, 2000**). Or ses capacités de transfert spontané de membrane à membrane sont quasi-nulles (**Simon *et al.*, 1999**). Du coup, même la génération de céramide peut conduire ce dernier à atteindre des concentrations locales très élevées, il n'y aura pas de redistribution spontanée vers d'autres compartiments

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

cellulaires (en excluant d'éventuels transporteurs spécifiques et flux vésiculaires). La conséquence directe de ce confinement est que d'éventuelles cibles du céramide doivent être présentes dans la membrane, ou être capables de s'y relocaliser. Se pose en outre le problème de l'accessibilité du céramide : les capacités de flip-flop de ce dernier sont l'objet de débat (**Bai et Pagano, 1997** et **Mitsutake et Igarashi, 2007**), mais si elles s'avéraient limitées, alors cela ajouterait une contrainte supplémentaire sur la localisation des cibles du céramide, nécessairement capables d'accéder au feuillet dans lequel serait généré le céramide. Enfin, se pose le problème de la zone du céramide, a priori très compacté dans la membrane, capable d'interagir avec la cible moléculaire.

De fortes contraintes semblent donc limiter l'action du céramide naturel, à longues chaînes (les céramides à courtes chaînes, comme le C2-céramide, possèdent des capacités de franchissement des membranes et de diffusion dans les cellules beaucoup plus proches de messagers secondaires classiques). Conjuguées aux propriétés d'interaction des sphingolipides, dont les têtes polaires sont donneuses et receveuses de liaisons hydrogènes, elles ont conduit à envisager que l'action du céramide soit structurale, c'est-à-dire passe par une modulation locale des propriétés des membranes dans lesquelles il est généré (**Cremesti et al., 2002**).

### *Le concept classique de la membrane plasmique :*

En 1972, Singer et Nicholson proposent un modèle décrivant la structure de la membrane plasmique, qui intègre les données biochimiques prouvant :

- qu'elle est essentiellement constituée de phospholipides, qui s'organisent spontanément en une bicouche en milieu aqueux, les têtes hydrophiles des molécules constituant la bicouche orientées vers l'extérieur à l'interface avec le milieu aqueux.

- qu'elle contient des protéines, dont l'intégration au sein de la bicouche lipidique a pu être révélée par l'avènement de la microscopie électronique et des préparations par cryofracture dans les années 50.

Dans ce modèle de mosaïque fluide, les phosphoglycérides s'organisent donc en une bicouche, mais conservent une mobilité latérale. Une des caractéristiques générales du modèle est qu'il assume une répartition homogène des lipides au sein des bicouches. Toutefois, dès la présentation de leur modèle, **Singer et Nicholson** n'excluent pas la possibilité que des domaines de petite taille (inférieurs à 100 nm), concentrant des lipides spécifiques, puissent exister, ce que semblent confirmer des observations réalisées dans les liposomes à la fin des années 70 (**Singer et Nicholson, 1972** et **Edidin, 2003b**). Mais de tels microdomaines ne sont l'objet que de publications sporadiques jusqu'aux années 90.

### *La notion de microdomaines dans les membranes modèles :*

Pour déterminer le comportement des lipides dans la membrane plasmique, une première série d'approches consiste à étudier le comportement biophysique de membranes modèles simulant les membranes plasmiques. Comme définie précédemment, la membrane plasmique est essentiellement constituée de glycérophospholipides (dont l'une des deux chaînes acyle fixée sur le glycérol est en général insaturée), certaines espèces étant cantonnées au feuillet interne comme le phosphatidylinositol, la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine (**Bretscher, 1973**, in **Munro, 2003** et **Edidin, 2003a**). Les sphingolipides, dont le squelette basé sur le céramide est donneur et accepteur de liaisons H, possèdent des chaînes dans lesquelles les molécules possèdent une très faible mobilité latérale et conformationnelle, basculent dans un état fluide (Ld, « liquid disordered »), où la mobilité latérale et conformationnelle sont fortement augmentées.

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

Si les bicouches ne se limitent plus à des phospholipides, mais contiennent également du cholestérol en quantité suffisante, on constate qu'une troisième phase peut apparaître : comme dans la phase gel ou So (« solid ordered »), cette phase possède une faible mobilité conformationnelle (les chaînes acyle sont très imbriquées les unes dans les autres), mais en conservant la mobilité latérale propre à la phase Lo (**Ipsen et al., 1987, et 1989**, cités dans **Simons et Vaz, 2004**). Les résultats expérimentaux suggèrent en outre que les phases Lo et Ld soient capables de coexister (**Munro, 2003**). De nombreux indices convergent vers une capacité identique des sphingolipides dans les bicouches de phosphoglycérides (recensés dans **Brown, 1998**). De façon plus significative encore, la présence de domaines Lo en parallèle à une phase Ld est détectée dans des bicouches constituées du mélange ternaire phosphatidylcholine, cholestérol, sphingomyéline (**Sankaram et Thompson, 1990** cité dans **Simons et Vaz, 2004**).

La base de cette hétérogénéité latérale serait l'affinité préférentielle du cholestérol pour la sphingomyéline (**Brown et London, 1998a**), quoique différents modèles expliquent cet effet (le cholestérol pourrait avoir un effet de condensation sur les chaînes acyle insaturées de la sphingomyéline, ou celle-ci pourrait jouer un rôle de bouclier par rapport au milieu aqueux vis-à-vis du cholestérol, ou encore le cholestérol pourrait se situer à la frontière des microdomaines (**Hancock, 2006**), les deux molécules étant ainsi isolées dans des microdomaines distincts du gros des phospholipides. Le cholestérol, par son rôle de compaction ou d'intercalant rigide entre les sphingolipides, expliquerait les propriétés particulières des phases Lo.

Outre la démonstration des hétérogénéités latérales, de tels dispositifs expérimentaux permettent la caractérisation poussée de ces microdomaines avec des outils relevant du champ de la physique, comme des microscopes à force magnétique, permettant d'évaluer les différences de hauteur dans les microdomaines. On a également pu démontrer la présence dans les phases Lo produites au sein de monocouche lipidique, du ganglioside GM1 et de la protéine à ancrage GPI Thy-1 (**Dietrich et al., 2001**, cité dans **Simons et Vaz, 2004**).

Mais c'est dans les modèles cellulaires que les rafts, ou radeaux lipidiques, ont été définis.

### *La notion de radeaux lipidiques :*

La notion de microdomaines lipidiques fonctionnels présents à la surface des cellules est apparue à la fin des années 80. Mais alors que les radeaux lipidiques sont à l'heure actuelle essentiellement étudiés dans des problématiques de transduction du signal, la notion initiale a été développée pour répondre à un problème biologique très particulier, l'adressage des lipides aux différents pôles des cellules épithéliales (**Edidin, 2003b**), dans la continuité directe des travaux de Palade et Rothman sur l'adressage des protéines à travers les différents sous-compartiments cellulaires.

Dans les cellules épithéliales, les membranes sont polarisées entre domaines apicaux et baso-latéraux, séparés par des jonctions serrées. Ces domaines sont caractérisés par des compositions lipidiques spécifiques : les membranes baso-latérales sont enrichies en glycosphingolipides (**Van Meer et Simons, 1982**) comme le prouve l'utilisation de virus se formant (libérés) à l'un ou l'autre des pôles de la cellule. La constitution d'une telle hétérogénéité dans la composition lipidique des membranes plasmiques est expliquée à l'époque par un adressage des glycosphingolipides réalisé à partir du Golgi, sur le modèle de l'adressage des protéines. On postule alors que les glycosphingolipides se rassemblent en des microdomaines, selon un mécanisme observé dans les membranes modèles. Ces rassemblements de glycosphingolipides constituent la première définition des rafts (**Simons et van Meer, 1988**).

Toujours dans le cadre des cellules épithéliales, une autre série de molécules, les protéines ancrées à la membrane par des groupements GPI (glycosylphosphatidylinositol) sont également concentrées au

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

pôle apical, le groupe GPI semblant être essentiel à cet adressage. Ceci suggérait que les protéines à ancrage GPI pourraient être adressées en se concentrant dans les microdomaines définis précédemment. Pour répondre à cette nouvelle question, Brown et Rose vont, en 1992, se servir d'une propriété des protéines à ancrage GPI démontrée peu de temps auparavant (**Hooper et Turner, 1988**), leur insolubilité lors d'une extraction à froid dans le détergent Triton X-100 : en suivant le trajet d'une phosphatase couplée à un groupement GPI, à travers le réticulum puis le golgi, jusqu'à la membrane plasmique, ils démontrent qu'à mi-chemin du golgi, la protéine devient insoluble dans le Triton X-100. Un fractionnement selon la densité révèle en outre que la phosphatase se trouvait dans une fraction de faible densité, riche en sphingolipides et cholestérol, contrairement à une protéine dépourvue de l'ancre GPI, que l'on retrouve dans des fractions de haute densité et pauvres en lipides (**Brown et Rose, 1992**). On aboutit donc, en passant d'une étude sur la ségrégation des lipides à un suivi de l'adressage de protéines particulières, à une nouvelle définition des rafts : il s'agit de microdomaines constituant une fraction de faible densité, insoluble dans le Triton X-100, enrichie en sphingolipides et en cholestérol, et contenant des protéines spécifiques. Les rafts apparaissent comme des entités stables, « flottant » (d'où leur nom) dans un « océan » de phospholipides (**Simons et Ikonen, 1997**).

Une seconde définition opérationnelle des rafts viendra se surajouter par la suite à l'insolubilité dans le Triton : la sensibilité de ces structures à la déplétion en cholestérol, notamment par la  $\beta$ -cyclodextrine (**Ilangumaran et Hoessli, 1998**).

### *Les déclinaisons du concept de raft :*

Mais c'est le champ de l'immunologie qui, en se servant des concepts précédents, va voir une véritable explosion de résultats impliquant les rafts. Le point de départ de ces nouveaux développements est l'observation que le cross-linking de protéines à ancrage GPI comme Thy-1 peut activer certaines cellules du système immunitaire. Ce résultat semble paradoxal car les ancres GPI ne s'étendent pas à l'intérieur des cellules, et ne peuvent donc contacter directement les kinases qui relaient l'activation à l'intérieur des cellules. De plus, les immunoprécipitations ne révèlent la présence d'aucune protéine intermédiaire, quoique les protéines à ancrage GPI précipitent les kinases comme Src. Ces résultats ont abouti à l'élaboration d'une nouvelle hypothèse : les protéines relayant l'activation des cellules seraient rassemblées dans un compartiment insoluble dans les détergents ; en d'autres termes, les rafts associés aux protéines à ancre GPI permettraient de rassembler les acteurs de l'activation. Ce concept, couplé à la technique d'extraction par le triton X-100, va conduire à une explosion de résultats visant à isoler les protéines comprises dans les rafts et engageant la signalisation T.

En outre, on observe qu'après cross-linking des protéines GPI, un certain nombre de protéines deviennent insolubles dans le Triton X-100 : elles semblent donc se relocaliser, et un nouveau concept émerge donc : les rafts permettraient de séparer de façon active les kinases impliquées dans l'activation, des phosphatases inhibant cette dernière.

Enfin, l'engagement de la molécule co-stimulatrice CD28 conduit à un recrutement accru de rafts, aboutissant à l'idée que la synapse immunologique est constituée par une coalescence des rafts auparavant épars.

Le bilan net de l'ensemble de ces résultats est de faire passer les rafts du statut de microdomaines impliqués dans l'adressage des lipides à des entités coordonnant la signalisation intracellulaire (**Hancock, 2006**).

### *Les questions ouvertes dans le domaine des rafts :*

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

Une série de controverses d'une ampleur proportionnelle aux résultats publiés a agité les études liées aux rafts, dégageant un certain nombre de questions portant sur :

- l'origine des microdomaines présents en surface des membranes plasmiques :

Tout d'abord, l'extension de la dénomination Lo des microdomaines présents dans les bicouches artificielles aux microdomaines des membranes plasmiques est contestée : d'abord, parce que les analyses biophysiques qui permettent de définir la phase « liquid ordered » ne sont pas applicables telles quelles aux membranes plasmiques, il n'est donc pas possible de définir les microdomaines cellulaires comme des phases spécifiques (**Simons et Vaz, 2004**). Ensuite, parce qu'un certain nombre de paramètres complexifient beaucoup la situation des membranes plasmiques comparées aux membranes modèles : la composition des membranes plasmiques comprend certes les 3 constituants phospholipides/sphingomyéline/cholestérol, mais avec une diversité d'espèces énorme, à laquelle s'ajoute la présence de nombreuses protéines ancrées via des ancrages lipidiques, associées à la membrane ou au contraire transmembranaires. De plus, des flux vésiculaires constants viennent affecter la composition des membranes plasmiques, et des ancrages entre les protéines transmembranaires et le cytosquelette d'actine induiraient une compartimentation de la membrane plasmique absente des modèles (**Hancock, 2006**).

Si le rôle de l'affinité préférentielle des sphingolipides et du cholestérol dans la formation des microdomaines est aujourd'hui reconnu, la définition des rafts adoptée lors du Keystone symposium dédié rejette le terme de « radeaux lipidiques » au profit de « radeaux membranaires », traduisant la reconnaissance croissante d'une composante d'interaction protéine/protéine dans la formation des microdomaines (**Pike, 2006**), même si les mécanismes détaillés restent encore à définir :

- Les protéines s'entourent-elles d'une « coque » de lipides (**Anderson et Jacobson, 2002**) ?

Ou les protéines se concentrent-elles à l'interface avec les phospholipides, jouant un rôle de surfactant (**Hancock, 2006**) ? La question n'est pas tranchée.

- la composition des rafts :

Si différentes pistes convergent vers une composition enrichie en sphingolipides et cholestérol (et est donc intégrée dans la définition unifiée des rafts, **Pike, 2006**), des interrogations subsistent, à la fois du fait de la remise en cause des techniques de caractérisation, mais aussi de par l'existence de résultats montrant l'existence de microdomaines dans les organelles où une telle composition ne semble pas possible.

- La taille des rafts :

L'explosion de résultats en immunologie a contribué à ce que des techniques d'imagerie de pointe comme le FRET, le FRAP ou le suivi de molécules individuelles marquées soient appliqués à l'étude des rafts. Un certain nombre de résultats ont abouti à la conclusion que les rafts étaient d'une taille bien plus réduite que ce qui avait été envisagé jusqu'alors : 5 à 20 nm en FRET, moins de 10 nm en suivi de molécules (**Hancock, 2006**). La question n'est pas que sémantique : des rafts de si petite taille ne peuvent renfermer que 3 à 4 protéines, remettant potentiellement en cause leur rôle comme modulateur de la transduction du signal. La question reste ouverte, la définition proposée au Keystone symposium se contentant d'une fourchette allant de 10 nm (taille évaluée à partir des modélisations d'observations en FRET, **Shaw, 2006**, et en deçà de laquelle une trop grande instabilité thermodynamique est prédite) à 200 nm (taille des caveolae, unanimement reconnues comme présentant les caractéristiques de rafts).

- la dynamique des rafts :

Cette question a été évaluée en parallèle à la dimension des rafts. Certaines observations ont conclu à une très grande instabilité des rafts, une donnée complexe à évaluer et dans laquelle interviennent de nombreux paramètres (la réduction de la ligne de tension entre phospholipides et microdomaines favorise la stabilité de grands rafts, mais l'accumulation de dipôles alignés à l'identique au sein des



## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

rafts a l'effet inverse, le tout étant complexifié par les modulations liées aux protéines s'accumulant à l'interface rafts/phospholipides, **Simons et Vaz, 2004**).

-La crédibilité des définitions opérationnelles des rafts :

Nous l'avons vu, deux outils ont été étroitement associés à l'essor de la notion de rafts en surface de membranes plasmiques : la résistance à l'extraction par les détergents non ioniques, et la sensibilité aux agents extracteurs de cholestérol. Tous deux ont subi de sévères remises en cause.

La sensibilité aux détergents non ioniques postule qu'après une extraction dans le Triton-X100 à 4°C, puis un isolement sur gradient de densité, une fraction insoluble de basse densité correspond aux domaines Lo, qui existeraient dans les membranes à 37°C et seraient conservés, avec leur contenu protéique, lors de cette procédure d'isolement.

Une première ligne de remise en cause tient à l'imprécision des protocoles qui ont été employés à la suite de la publication princeps de Brown et Rose : le matériel de départ varie (extraits cellulaires totaux versus membranes isolées), le ratio détergent/lipides n'est pas fixé, tout comme la température, dont le rôle est pourtant crucial dans les problèmes de formation de phases au sein des lipides, la quantification des protéines entre fractions solubles et non-solubles est rarement réalisée (**Edidin, 2003b**).

Une seconde série de doutes porte sur la complexité du mode d'action des détergents, et la pertinence d'en tirer des conclusions adéquates sur la localisation des protéines dans des microdomaines (**Hancock, 2006**) : une solubilisation par les détergents suppose que les molécules de détergents s'immiscent dans la bicouche lipidique jusqu'à atteindre une quantité suffisante pour provoquer la formation de micelles arrachées à cette membrane (**Lemaire et al., 2000**). Durant ce processus, un certain nombre de réarrangements peuvent se produire :

- le détergent peut contribuer à la formation de microdomaines par lui-même, un phénomène observé dans les membranes modèles (**Heerklotz, 2002**), ou induire la fusion entre des domaines préexistants

- le détergent peut solubiliser des protéines indépendamment de leur localisation dans une phase ordonnée, avec l'exemple frappant de différences du simple au triple entre la localisation d'une protéine à ancrage GPI dans une membrane modèle, suivant que le suivi soit optique ou effectué par purification (**Kahya et al., 2005**). A l'inverse, certaines protéines dont on soupçonne par ailleurs la localisation dans les rafts ne sont pas insolubles dans le Triton-X100 (**Simons et Vaz, 2004**).

- enfin, le détergent peut avoir une action spécifique sur les bicouches : la formation des micelles peut entraîner un mélange entre les deux couches, ou la différence de sensibilité entre les deux feuillettes peut conduire à la formation de structures transitoires instables comme des monocouches, non représentatives de la membrane plasmique dont elles sont issues. Et l'observation de l'action des détergents semble montrer l'apparition de larges zones de la membrane qui auraient subi une extraction, en contradiction avec la taille supposée limitée des rafts (**Munro, 2003**).

Il est donc difficile d'établir dans quelle mesure le paramètre « insolubilité aux détergents » reflète l'état d'organisation de la membrane.

La sensibilité à l'extraction du cholestérol fait également l'objet de mises en garde : le cholestérol est impliqué dans de nombreuses fonctions hors des rafts, et l'altération de ces fonctions pourrait interférer avec une interprétation simple des résultats ciblés sur les rafts (**Munro, 2003**) : ainsi, le cholestérol diminue fortement la perméabilité membranaire, il interagit avec différentes protéines de façon directe (**Munro, 2003**), est impliqué dans les flux vésiculaires et le turn-over des lipides (**Edidin, 2003b**), et intervient globalement dans la mobilité latérale de la membrane plasmique (**Hancock, 2006**).

# Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

## *Un domaine moins controversé : la fusion des radeaux lipidiques*

Moins débattue que la nature des rafts est leur capacité à s'agréger en de larges plateformes (définition du Keystone Symposium, **Pike, 2006**). Cette reconnaissance provient largement de l'implication de cette agrégation à des mécanismes bien connus : ainsi, la formation des caveolae, des invaginations présentes en surface des cellules et organisées autour de la protéine membranaire cavéoline oligomérisée, et qui rassemble des rafts en une structure atteignant de 50 à 100 nm. Autre exemple, la formation de l'enveloppe entourant le virus de la grippe semble s'effectuer dans une zone de la membrane plasmique où s'est produite une coalescence de rafts (**Simons et Vaz, 2004**). Dernier exemple, que nous allons détailler, la réorganisation des radeaux lipidiques sous l'effet du céramide.

- l'impact du couple sphingomyélinase acide/ céramide sur les membranes-modèles

Avant de présenter la relation entre céramide et remodelage des membranes plasmiques cellulaires, nous allons brièvement décrire les résultats obtenus par des approches biophysiques sur l'impact direct du céramide, ou de sa génération par la sphingomyélinase acide, sur la structure de membranes-modèles.

De très nombreuses publications ont montré qu'à l'instar du cholestérol et de la sphingomyéline, le céramide entraîne la ségrégation de domaines  $L_0$  lorsqu'il est présent dans des bicouches de phospholipides (**Veiga et al., 1999**). Si ce rôle a pu être remis en cause (**Fidorra et al., 2006**), il semble que ce soit essentiellement dans des modèles où la quantité de cholestérol est telle qu'elle fige l'ensemble de la membrane en  $L_0$  (**Silva et al., 2007**). A nouveau, ce rôle est limité aux céramides à longues chaînes acyle (**Huang et al., 1999**).

En outre, ce rôle du céramide semble s'étendre :

- aux membranes constituées du mélange ternaire phospholipides/cholestérol/sphingolipides: les céramides à longues chaînes  $\gamma$  entraînent l'apparition de nouveaux domaines organisés (alors que les céramides à courtes chaînes déstabilisent au contraire les domaines préexistants) (**Chiantia et al., 2007**). Le céramide semble capable d'entrer en compétition avec le cholestérol, un effet parfois expliqué par l'« effet parapluie » (une compétition entre sphingolipides et cholestérol pour réaliser l'interface entre phospholipides et milieu aqueux) (**Ali et al., 2006** et **Megha et London, 2004** et **Megha et al., 2006**).

- aux membranes constituées de sphingomyéline, auxquelles le céramide confère une résistance à l'extraction aux détergents en plus d'entraîner l'apparition de domaines organisés (**Sot et al., 2006**) confirmant les capacités d'autoassociation du céramide qui le conduisent à s'accumuler dans des domaines distincts des domaines riches en cholestérol et sphingolipides (**Kolesnick et al., 2000**).

La conversion de la sphingomyéline en céramide par injection dans des vésicules ou application localisée en fixant l'enzyme sur des billes (respectivement, **Holopainen et al., 2000** et **Nurminen et al., 2002**) dans les membranes-modèles organisées en vésicules entraîne la formation de petits domaines membranaires (ou patches), présentant une courbure négative, et qui fusionnent en de larges domaines enrichis en céramide. Ces expériences ont conduit le céramide à être désigné comme « fusogenic » (**Kolesnick et al., 2000**).

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

Enfin, la synthèse de l'action des deux agents, céramide ou sphingomyélinase acide, a été réalisée dans une étude publiée par Johnston en 2008 : une bicouche de composition ternaire (phospholipides, cholestérol, sphingolipides) simulant la membrane plasmique est étudiée par microscopie à force atomique, microscopie confocale, et microscopie par évanescente (ou TIRF), pour étudier l'évolution des domaines préexistants sous l'action du céramide ou de la sphingomyélinase. On observe dans les deux cas, même si les phénomènes sont beaucoup plus marqués sous l'effet de l'enzyme, un élargissement des domaines préexistants, ainsi qu'une coalescence entre les différents domaines. On aboutit donc à une membrane très hétérogène, présentant des zones totalement fluides et inorganisées, et des domaines ordonnés, de hauteur variable, les plus hauts pourraient correspondre aux domaines enrichis en céramide, à courbure négative, entourant des rafts constitués de cholestérol et de sphingolipides. Le passage de l'un à l'autre des domaines se ferait par génération du céramide, compétition avec le cholestérol et flip-flop vers le feuillet interne. L'activité enzymatique semble se concentrer dans les zones d'interface entre rafts et phospholipides, et les clusters progressent à des vitesses variables suivant l'intensité de l'activité enzymatique présente dans chaque domaine individuel, englobant parfois des petites zones fluides. Globalement, le phénomène est maximum sur les 5 premières minutes, puis se poursuit à un rythme constant sans l'enzyme sur l'heure suivante (**Ira et Johnston, 2008**). Ces résultats confirment l'impact du céramide en termes de génération et de fusion des microdomaines, avec des cinétiques très rapides, et postule que l'activité enzymatique puisse se concentrer à la zone de jonction entre les rafts et le reste de la membrane plasmique.

-la modulation des rafts par le couple sphingomyélinase acide / céramide dans les membranes plasmiques :

En se basant sur les premiers résultats obtenus dans les systèmes biophysiques, les équipes de Richard Kolesnick et Erich Gulbins ont entrepris d'explorer, au début des années 2000, la notion de coalescence des rafts sous l'impact du céramide. Leurs approches, centrées sur l'implication de cette modulation dans l'agrégation des récepteurs et, dans une moindre mesure, dans l'interaction de parasites avec les cellules de l'hôte, ont été complétées par des études portant sur l'action non-canonique de certains agents chimiothérapeutiques et des rayons UV. Nous présenterons brièvement chacun de ces champs avant d'aborder le modèle unifié créé par Kolesnick et Gulbins.

L'intervention du céramide dans le remodelage membranaire a principalement été étudiée dans le cadre de l'agrégation des récepteurs. Ces travaux poursuivent ceux engagés dans les années 90, essentiellement en immunologie, montrant qu'un grand nombre de récepteurs s'agrègent au cours de leur interaction avec leurs ligands. Comme nous l'avons évoqué dans la partie précédente, l'explosion du nombre de travaux se basant sur la notion d'insolubilité des rafts lors d'une extraction par les détergents a principalement concerné ces mêmes récepteurs des cellules immunitaires (CD28, protéines à ancrage GPI). En outre, si quelques travaux évoquent alors le rôle du céramide dans l'action des systèmes CD40 (hormis les résultats montrant l'existence d'une voie connectant le CD40 et la sphingomyélinase neutre via la protéine FAN, **Koppenhoffer et al., 1997**, et **Segui et al., 1999**) et TRAIL, la connexion entre CD95 et le couple sphingomyélinase acide/céramide est bien mieux établie : le couple relaie le signal apoptotique issu des récepteurs, à la fois dans des modèles de lignée lymphocytaire (**Cifone et al., 1994 et 1995**) et hépatocytaire (**Paris et al., 2001**), et divers modèles prouvent l'importance de cette voie in vivo : ainsi, l'inactivation génétique de la

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

sphingomyélinase acide protège les animaux d'une hépatite fulgurante provoquée par l'injection du ligand de Fas (**Lin et al., 2000**) ou de la déplétion des lymphocytes provoquée par l'injection de CD4, ou encore d'une destruction hépatique auto-immune provoquée en injectant de la phytohématoglutinine, deux stratégies relayées par le CD95 (**Kirschnek et al., 2000**). Les équipes de Kolesnick et Gulbins ont donc étudié la place que pouvait jouer le couple sphingomyélinase acide/céramide dans l'agrégation et la signalisation du récepteur Fas/CD95 (dans les lymphocytes T puis les hépatocytes), du récepteur CD40 et du récepteur de TRAIL, DR5 (dans les lymphocytes B). Ce sont les résultats portant sur le CD95 qui sont les plus importants et vont permettre de définir les principaux points du modèle.

En parallèle, les travaux d'Erich Gulbins montrent qu'un certain nombre de bactéries interagissent avec la sphingomyélinase acide des cellules de l'hôte qu'elles infectent : ainsi, *Neisseria gonorrhoeae* ne peut pénétrer dans les cellules non phagocytaires (cellules épithéliales et fibroblastes) et les neutrophiles (**Grassmé et al., 1997** et **Hauck et al., 2000** respectivement) si celles-ci sont dépourvues de la sphingomyélinase acide. De même, *Staphylococcus aureus* déclenche une apoptose médiée par la sphingomyélinase acide dans les cellules endothéliales (**Esen et al., 2001**). Le dernier modèle étudié par Gulbins est *Pseudomonas aeruginosa*, qui, sans que l'intervention de la sphingomyélinase soit encore montrée, semble activer une réponse CD95 indispensable cette fois à la réponse de l'hôte (**Grassmé et al., 2000**). Comme dans le cas des récepteurs, on voit se dessiner un rôle du couple sphingomyélinase/acide, dans un domaine où à nouveau de nombreux résultats attribuent un rôle important aux rafts.

Le cas de certains agents chimiothérapeutiques et des rayonnements ultraviolets est plus complexe. Leur mode d'action a principalement été étudié en rapport à leur action sur l'ADN. Pourtant, un certain nombre de travaux montrent, à l'instar des résultats présentés pour l'irradiation ionisante à forte dose, que ces agents pourraient activer des voies de transduction directes, indépendamment des systèmes détectant les dommages à l'ADN. Parmi ces voies, on trouve un certain nombre de résultats montrant l'implication potentielle du couple sphingomyélinase acide/céramide, principalement sous l'effet des rayonnements ultraviolets : d'abord, parce que ceux-ci entraînent, dans certaines études, une agrégation des récepteurs de mort (**Chatterjee et Wu, 2001**), ou, de façon plus directe, parce que l'inactivation de la sphingomyélinase acide empêche la signalisation de mort de se produire dans les lymphoblastes soumis aux UVA (**Huang et al., 1997**), dans les kératinocytes soumis aux UVB (**Magnoni et al., 2002**), dans les lymphoblastes ou les HeLa soumis aux UVC (**Komatsu et al., 2001** et **Kashkar et al., 2005**).

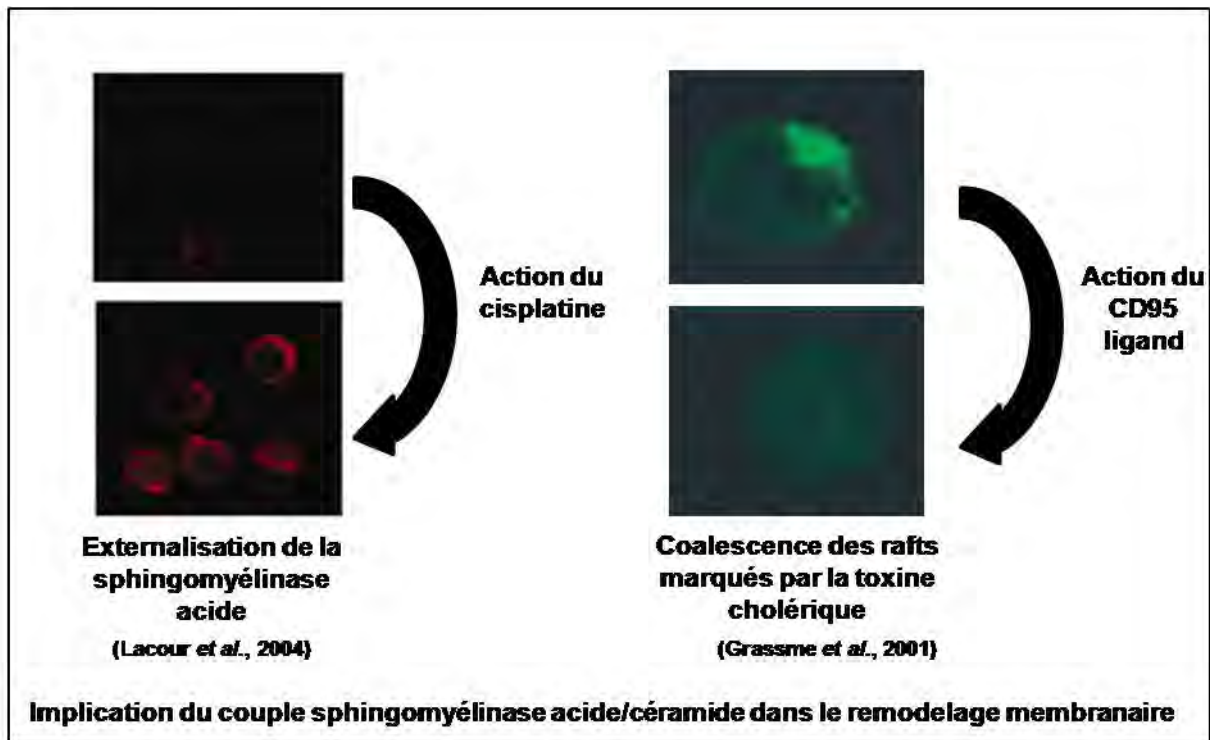
Le modèle élaboré par Kolesnick et Gulbins (**Gulbins et Kolesnick, 2003**) est basé sur les axes suivants :

- L'engagement du récepteur par son ligand entraîne une activation et une externalisation rapides de la sphingomyélinase acide au niveau des rafts, dans le feuillet externe de la membrane plasmique
- La sphingomyélinase acide externalisée clive la sphingomyéline, générant le céramide dans les rafts
- le céramide entraîne la coalescence des rafts en de larges plateformes
- ces larges plateformes permettent l'agrégation du récepteur et le déclenchement de la signalisation aval

Le modèle a été très largement démontré dans le système FasL/Fas (**Grassme et al., 2001a, 2001b, Cremesti et al., 2001** et **Grassmé et al., 2003a**), dans le système CD40L/CD40 (**Grassmé et al., 2002** et **Bock et Gulbins, 2003**) et enfin dans le système TRAIL/DR5 (**Dumitru et Gulbins, 2006**). La base du

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

mécanisme, c'est-à-dire l'externalisation de la sphingomyélinase acide, la génération de céramide dans les rafts et l'agrégation de ces derniers en de large plateformes, a également été démontrée lors de l'interaction des bactéries (*N.gonorrhoeae* : Hauck *et al.*, 2000, *P.aeruginosa* : Grassmé *et al.*, 2003b, *S.aureus* : Esen *et al.*, 2001) et des rhinovirus (Grassmé *et al.*, 2005) avec les cellules de l'hôte et est venue renforcer l'hypothèse qu'une partie des effets de certains agents chimiothérapeutiques (doxorubicine : Dumitru *et al.*, 2007, cisplatine : Lacour *et al.*, 2004, rituximab : Bezombes *et al.*, 2004) et des rayonnements ultraviolets (Charruyer *et al.*, 2005 et Rotolo *et al.*, 2005) est médiée par un effet direct de remodelage membranaire.



Pour établir cette cascade d'évènements, la stratégie consiste à

- en observer les différentes composantes : l'activation (essai DAG-kinase, mesure de la sphingomyéline) et l'externalisation (FACS, immunofluorescence, microscopie électronique) de la sphingomyélinase acide, la génération de céramide (FACS et immunofluorescence), la réorganisation des rafts (immunofluorescence en utilisant les marqueurs GM1 ou Thy-1, extraction par les détergents),

- bloquer étape par étape : la sphingomyélinase peut être invalidée génétiquement ou bloquée pharmacologiquement (désipramine, SR33775), le céramide peut être neutralisé par un anticorps ou des domaines de liaison potentiels issus de protéines-cibles (KSR, Raf), les rafts peuvent être bloqués en extrayant ( $\beta$ -cyclodextrine) ou en fixant (filipine, nystatine) le cholestérol

- réverser les effets des inhibiteurs en ajoutant de la sphingomyélinase ou du céramide exogènes.

Il existe un certain nombre de variations dans le modèle. La principale concerne le mécanisme conduisant à l'externalisation de la sphingomyélinase acide (dont on ne sait exactement à l'heure actuelle s'il s'agit d'une forme sécrétée ou lysosomiale particulière) :

Les observations réalisées en microscopie électronique dans le cadre de l'action du récepteur Fas laissent à penser que la sphingomyélinase pourrait être prépositionnée dans des vésicules (Grassmé *et al.*, 2001), conduisant Verheij à postuler que l'activation de l'enzyme pourrait démarrer dans des vésicules de recyclage endosomal, qui fusionneraient avec la membrane, libérant l'enzyme sur le

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

feuillet externe (**Van Blitterswijk et al., 2003**). L'activité de l'enzyme pourrait être nécessaire à la fusion vésiculaire (**Charruyer et al., 2005**).

Toujours dans le système CD95, les efforts conjoints des équipes Kolesnick et Gulbins ont abouti à un modèle dans lequel l'engagement d'un nombre minimal de récepteurs permet l'activation d'un pool limité de caspase 8 qui, relayée par un mécanisme dépendant de l'actine et des microtubules, entraînerait l'externalisation de la sphingomyélinase (**Grassmé et al., 2003b**), un mécanisme également démontré lors de l'action des rhinovirus (**Grassmé et al., 2005**). Pourtant, ce mécanisme ne semble pas pouvoir être généralisé à tous les modèles, et notamment, l'externalisation de la sphingomyélinase sous l'effet des UVC (**Rotolo et al., 2005**), soulignant l'existence de mécanismes complémentaires.

De multiples résultats suggèrent également une intervention des espèces radicalaires activées (ROS), comme mécanisme intermédiaire dans l'externalisation de la sphingomyélinase acide. Les ROS sont essentiellement étudiés dans le cadre de leur génération par les mitochondries, mais un certain nombre de sources non mitochondriales existent également : lipoxygénase, cytochrome P450, NADPH oxydase (**Yin, 2005**). Un certain nombre d'études montrent une connexion entre les ROS et la génération de céramide : le peroxyde d'hydrogène entraîne, lorsqu'il agit sur les membranes des cellules épithéliales, la génération de céramide (**Godkorn et al., 1998**), et les systèmes de détoxification cellulaires modulent la quantité de céramide présente dans la cellule (**Barroso et al., 1997**). Même si des niveaux d'interactions multiples existent entre les espèces radicalaires et les voies de génération du céramide, une hypothèse reliant spécifiquement la génération de radicaux libres et l'activation de la sphingomyélinase acide a émergé à travers plusieurs publications : le peroxyde d'hydrogène active la sphingomyélinase acide (**Komatsu et al., 2001**), et ce mécanisme pourrait passer par l'oxydation d'un groupement inhibiteur thiol, favorisant potentiellement une dimérisation de l'enzyme (**Qiu et al., 2003**). Il semble possible que les deux mécanismes s'amplifient mutuellement, la sphingomyélinase activant la NADPH oxydase (**Reinehr et al., 2005**).

Ces données impliquant les espèces radicalaires ont été complétées par des études qui les rattachent au modèle de fusion des plateformes membranaires : inhiber les espèces radicalaires empêche TRAIL d'activer la sphingomyélinase acide, et de générer ainsi de larges plateformes enrichies en céramide (**Dumitru et Gulbins, 2006**). Les plateformes pourraient recruter des composants de la NADPH oxydase, et enclencher ainsi une boucle de rétroaction positive avec l'activation et l'externalisation de la sphingomyélinase acide, notamment dans les cellules endothéliales (**Zhang et al., 2007**). Cette interaction entre coalescence des rafts et activation de la sphingomyélinase acide pourrait expliquer pourquoi des inhibiteurs de rafts empêchent la translocation de la sphingomyélinase acide (**Charruyer et al., 2005**), même si des données inverses existent (**Grassmé et al., 2002**).

La seconde interrogation qui se dégage dans le paradigme établi par Gulbins et Kolesnick est celle de la compréhension de l'impact des plateformes sur la signalisation sous-jacente. Le concept a initialement été élaboré pour expliquer l'agrégation qui suit l'engagement de certains récepteurs par leurs ligands. La ségrégation du récepteur au sein des plateformes était, dans ce cadre, restreinte à la forme activée des récepteurs (**Bock et Gulbins, 2003**). Les récepteurs concentrés dans les plateformes étaient à même d'engager une signalisation aval efficace, par exemple en induisant la formation du complexe DISC dans le cas du CD95 (**Grassme et al., 2003a**). Mais la question semble plus ardue dans le cadre de stress au sens larges, chimiothérapies ou rayonnements, car alors la base de la sélectivité, le récepteur engagé, fait défaut, et comprendre comment un phénomène général comme semble l'être l'agrégation des plateformes peut moduler un phénomène de transduction spécifique constitue un véritable enjeu de ce champs.

## Introduction : Mort radioinduite de l'endothélium

---

Toutefois, dans le cas des agents chimiothérapeutiques et des UV, l'implication de la sphingomyélinase est plus difficile à cerner du fait de l'existence de voies multiples : ainsi, des résultats suggèrent une activation de la céramide synthase ou de la sphingomyélinase neutre lors d'une exposition à la daunorubicine (**Bose *et al.*, 1995**, et **Mansat de Mas *et al.*, 1999**, respectivement), à la doxorubicine (**Gouazé *et al.*, 2001** et **Mercier *et al.*, 2003**) ou au cisplatine (**Noda *et al.*, 2001**). On mesure également une activation de la sphingomyélinase acide après 3 à 7 jours d'exposition à la doxorubicine (**Andrieu-Abadie *et al.*, 1999**).

## Problématique

La première partie de nos travaux a pour objectif de clarifier la séquence des évènements qui mènent de l'irradiation à forte dose à la destruction précoce des cellules endothéliales. Nous chercherons à étudier la relation entre les principaux acteurs moléculaires de cette apoptose endothéliale, étudiés jusqu'ici de façon largement disjointe :

- la sphingomyélinase acide, dont l'engagement a été particulièrement décrit dans les modèles murins
- le céramide, dont l'impact sur le remodelage membranaire est principalement décrit dans des modèles non endothéliaux
- la voie de mort p38, activée dans les cellules endothéliales primaires suite à une irradiation à haute dose, mais surtout étudiée dans le contexte de réponse aux dommages à l'ADN dans les cellules tumorales. Or, c'est justement l'origine membranaire de la voie de mort qui avait constitué l'originalité des travaux portant sur la réponse de l'endothélium à l'irradiation, dans un champ où la place prédominante revient aux voies de réponses nucléaires.

Définir une telle séquence à l'échelle moléculaire permettra d'approfondir le concept de l'endothélium comme cible primaire de l'irradiation, jusqu'ici essentiellement fondé sur des approches *in vivo*.

La seconde partie de nos travaux étudie si la sphingosine-1-phosphate, un facteur pro-angiogénique considéré comme un antagoniste naturel du céramide, peut moduler cette apoptose endothéliale. En couplant approches cellulaires et modèles animaux, notre objectif est d'abord de savoir si une autre molécule naturelle que le bFGF et l'angiopoïétine peut être administrée de façon systémique pour protéger les cellules endothéliales intestinales. Mais nous cherchons en outre à mieux comprendre les bases moléculaires d'une protection spécifique de l'endothélium. L'enjeu est ici non seulement de vérifier si le concept de cible primaire est opérant, mais également de jeter les bases d'une modulation de la mort de l'endothélium par les facteurs pro-angiogéniques, qui pourra ensuite être appliquée soit dans le domaine de la radioprotection, soit dans les stratégies de radiothérapie antitumorale.



# Résultats

---

## I. Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire :

### 1) Les radiations entraînent l'apoptose des cellules microvasculaires via le couple ASM/céramide et la voie p38 :

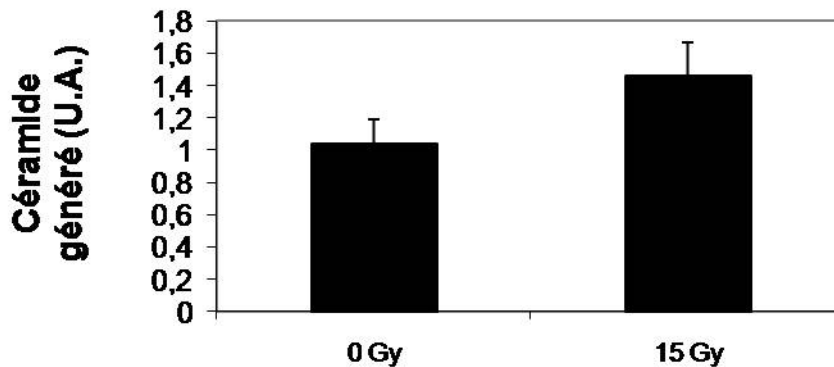
1. Le modèle HMEC-1 vérifie l'engagement du couple ASM/céramide par l'irradiation haute dose

L'engagement du bloc sphingomyélinase acide/céramide par l'irradiation unique à forte dose (15 Gy) a initialement été démontré en utilisant des cultures de cellules endothéliales issues de macrovaisseaux bovins (**Fuks *et al.*, 1994**, et **Haimovitz-Friedman *et al.*, 1994**). Les travaux ultérieurs, basés sur des modèles animaux, principalement les souris invalidées pour la sphingomyélinase acide, ont confirmé ces résultats (**Santana *et al.*, 1996**), en précisant que la cible de l'irradiation était en fait l'endothélium microvasculaire (**Paris *et al.*, 2001b**).

Nous avons donc choisi d'utiliser un modèle de cellules microvasculaires facilement manipulable, les cellules HMEC-1, immortalisées par l'antigène T (**Ades *et al.*, 1992**), et utilisées sur un nombre de passages restreints (entre les passages 14 et 20). Dans un premier temps, il nous fallait vérifier si notre modèle répondait à l'irradiation unique à forte dose par un engagement du couple sphingomyélinase acide/céramide menant à l'apoptose, conformément au modèle établi par Kolesnick.

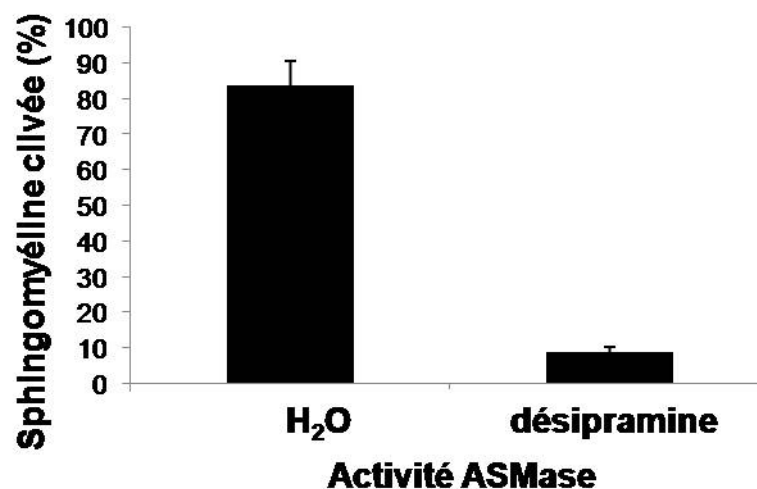
L'irradiation des cellules HMEC-1 à 15 Gy induit la génération rapide, dès les 5 premières minutes post-irradiation, de céramide, mesuré par essai DAG-kinase (1,03 U.A. +/- 0,21 à 0 Gy contre 1,46 U.A. +/- 0,21 à 15 Gy, **fig. 1**). Cette cinétique concorde très bien avec celle obtenue en irradiant les cellules BAECs.

## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire



**Figure 1:** L'irradiation à forte dose entraîne la génération rapide de céramide. Quantification du céramide par essai DAG kinase dans les cellules HMEC-1, (moyenne +/- E.T. du pic de céramide, généré aux temps inférieurs à 3 minutes après irradiation, pour 6 expériences indépendantes. ( $P \leq 0.05$ ))

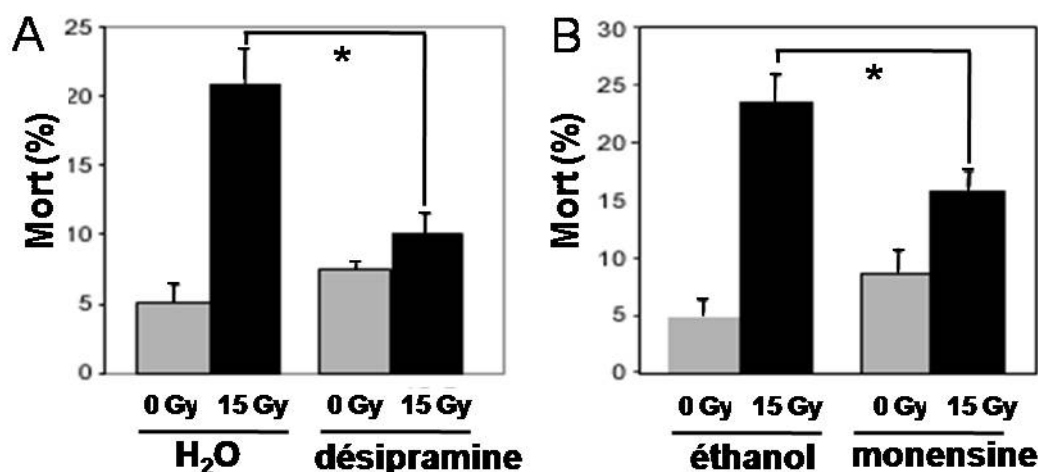
Une telle génération de céramide a été attribuée à l'action d'une sphingomyélinase acide, et déclenche l'apoptose des cellules endothéliales (HF, JEM, 1994). Nous avons donc exposé les cellules HMEC- à un inhibiteur pharmacologique de la sphingomyélinase acide, la désipramine (Hurwitz *et al.*, 1994, et Kolzer *et al.*, 2004) avant l'irradiation à 15 Gy. La désipramine bloque efficacement l'activité de la sphingomyélinase acide (fig.2), et donc la génération radioinduite de céramide.



**Figure 2:** La désipramine inhibe efficacement la sphingomyélinase acide dans les cellules microvasculaires. Activité sphingomyélinase acide des cellules HMEC1, traitées ou non avec 50  $\mu$ M de désipramine (n=1).

En outre, elle abolit la vague d'apoptose que l'on détecte 24h après irradiation (indice de mort : 20,9% +/- 2.4 à 15 Gy contre 9.9 +/- 1.5 à 15 Gy avec pré-traitement en désipramine, fig.3A). Cette protection conférée en bloquant la sphingomyélinase acide est confirmée par l'usage d'un autre inhibiteur, la monensine (indice de mort : 23,4% +/- 2.2 à 15 Gy contre 14.9% +/- 2.8 à 15 Gy avec pré-traitement en monensine, fig.3B).

## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire



**Figure 3: La sphingomyélinase acide contrôle l'apoptose radioinduite.** Indice de mort des cellules HMEC-1 traitées ou non avec 50  $\mu$ M de désipramine (A), ou 0.05  $\mu$ M de monensine (B), établi par comptage, 24 h. après irradiation à 15 Gy. (moyenne  $\pm$  E.T. de trois expériences indépendantes réalisées en duplicate) (\*  $P < 0.05$ )

Notre modèle de lignée microvasculaire présente donc bien une génération du céramide par la sphingomyélinase acide suite à une irradiation unique à forte dose, et une vague d'apoptose précoce qui survient 24h après irradiation, sous le contrôle de ce couple sphingomyélinase acide/céramide.

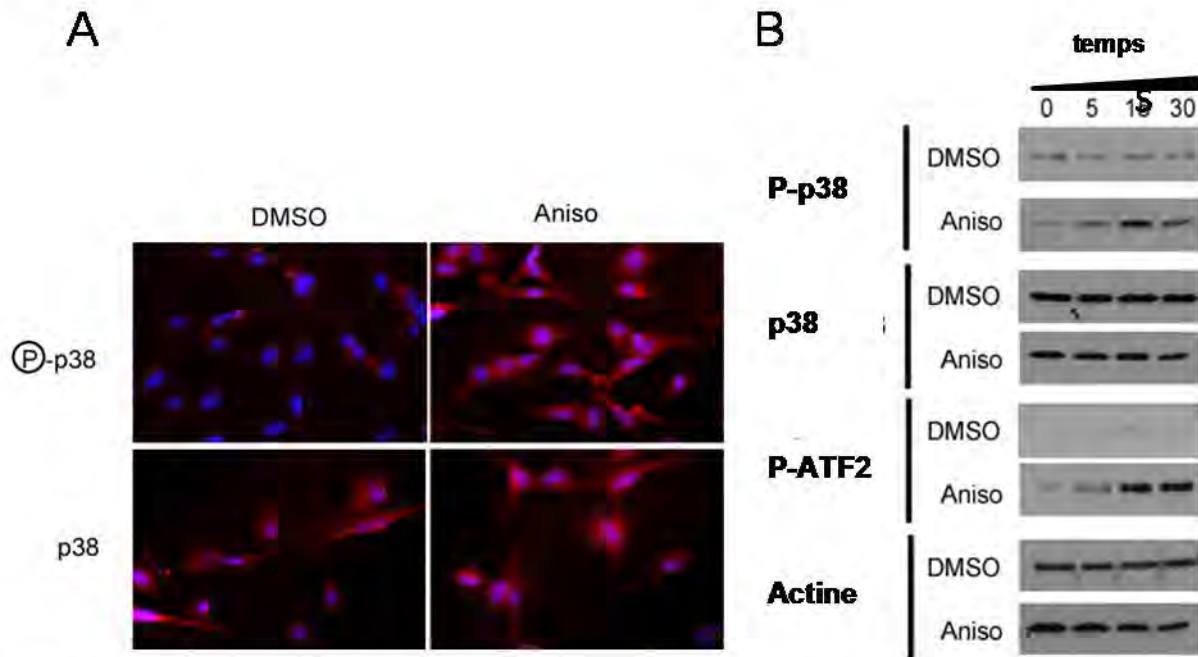
2. Une voie p38 pro-apoptotique est activable (pharmacologiquement et par l'irradiation) dans les cellules HMEC-1

Les travaux étudiant les voies de mort déclenchées par l'irradiation dans les cellules endothéliales, dans le cadre de l'engagement du couple sphingomyélinase acide/céramide (Verheij *et al.*, 1996), ou en dehors (Kumar *et al.*, 2004), convergent vers l'engagement précoce de la voie des SAPK. A nouveau, nous avons souhaité valider que notre modèle s'inscrive dans ce type de réponse pro-apoptotique médiée par les kinases de stress. Nous nous sommes concentrés sur la MAPK p38, dont l'activation a été validée dans des cellules microvasculaires primaires (Kumar *et al.*, 2004).

L'anisomycine est un inducteur classique des SAPK Jnk (Cano *et al.*, 1994) comme p38 (Lim *et al.*, 1998), validé dans les cellules endothéliales (Eguchi *et al.*, 2007). Nous l'avons utilisée pour confirmer dans le modèle HMEC-1 l'existence d'une voie pro-apoptotique p38:

L'anisomycine induit une phosphorylation rapide de p38, détectée en immunofluorescence (fig.4A) et en western blot ainsi que de sa cible ATF-2 (fig.4B).

## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire

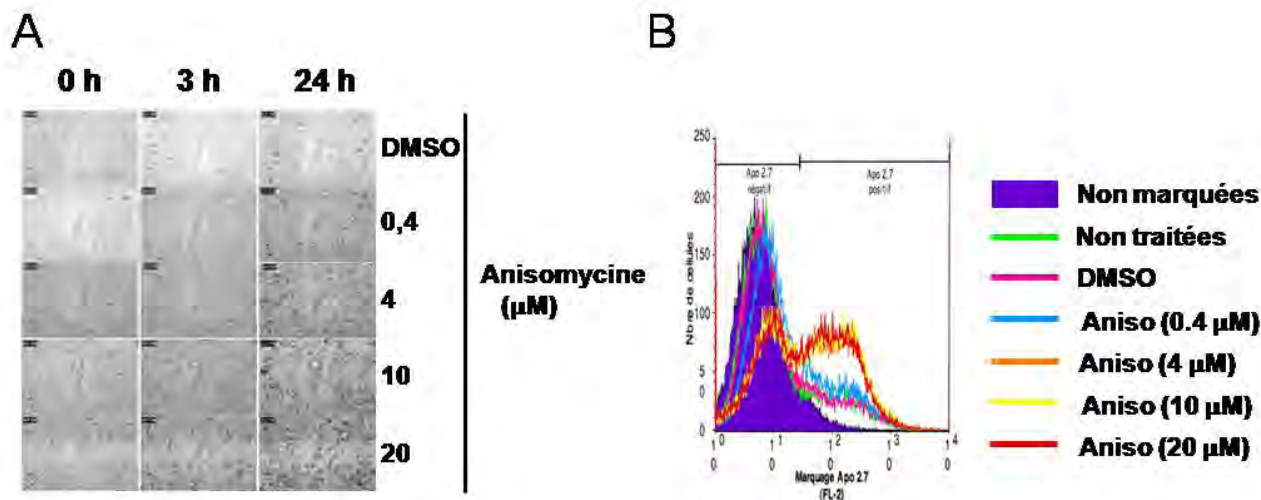


**Figure 4: La voie p38 est inductible dans les cellules HMEC1.**

- A.** Marquage immunocytologique de p38, phosphorylé ou total (rouge) dans les cellules HMEC-1 15 min après traitement par 4  $\mu$ M d'anisomycine. (microscope à fluorescence Apotome - bleu: noyau/contre-marquage nucléaire Hoechst - grossissement x 200).
- B.** Western blot évaluant la phosphorylation de p38 et ATF2 vis-à-vis de p38 total et de l'actine, respectivement, dans les cellules HMEC1 traitées avec une dose de 4  $\mu$ M d'anisomycine

Elle provoque la mort temps et dose-dépendante des cellules HMEC-1 (fig.5A), par un mécanisme apoptotique (fig.5B, validée en comptage, non-montré).

## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire



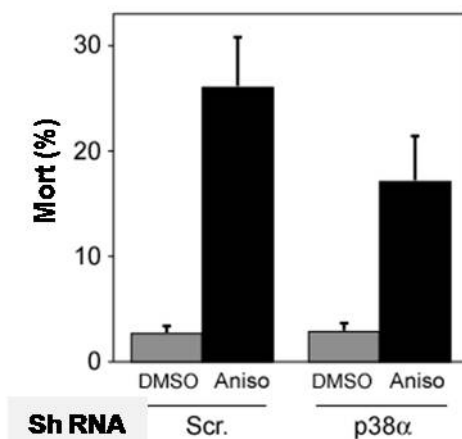
**Figure 5: L'anisomycine déclenche l'apoptose des cellules microvasculaires.**

- A. Observation en contraste de phase des cellules HMEC-1, 3h et 24h après traitement avec des doses croissantes d'anisomycine (contraste de phase, grossissement x 40)
- B. Détermination par cytométrie en flux du nombre de cellules HMEC-1 en apoptose par marquage Apo2.7, 24h après traitement par des doses croissantes d'anisomycine (droite). Les plots d'une expérience réalisée en triplicate sont représentés.

Ce mécanisme de mort est médié en partie par p38, puisqu'un shARN dirigé contre p38 $\alpha$  l'entrave partiellement (fig.6, indice de mort : 26.04% +/- 2.7 pour le shARN contrôle avec irradiation, contre 17.1% +/- 2.5 avec le shARN contre p38 et l'irradiation, mais différence statistiquement non significative).

## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire

---



**Figure 6: La voie p38 contribue à l'effet pro-apoptotique de l'anisomycine.**

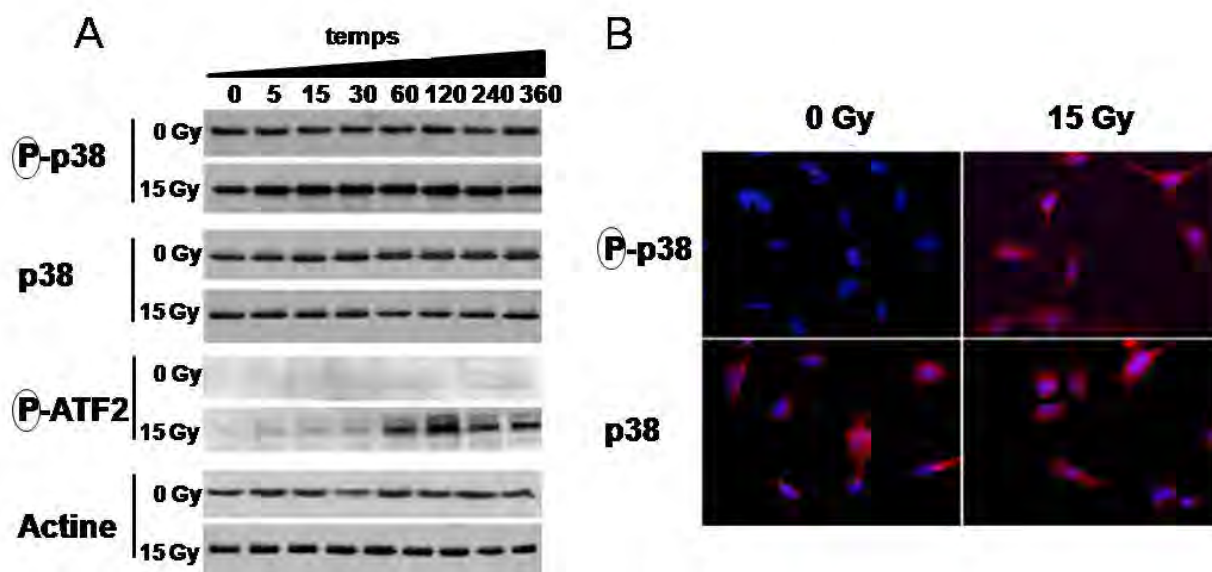
Indice de mort établi par comptage, 24h après traitement des cellules HMEC-1, exprimant de façon stable un sh RNA contrôle (scr) ou un shRNA ciblant p38 $\alpha$  (p38 $\alpha$ ), par 4  $\mu$ M d'anisomycine (Aniso). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes réalisées en duplicate.

Une voie p38 est donc bien fonctionnelle dans notre modèle, et pro-apoptotique.

3. L'IR forte dose entraîne l'apoptose des cellules microvasculaires par activation de la voie p38

L'irradiation déclenche une phosphorylation de p38 rapide (visible dès une minute) et soutenue (2h), atteignant son maximum à 30 minutes (**fig.7A**). La phosphorylation de p38 a également été vérifiée par immunofluorescence, 30 min après irradiation (**fig.7B**). Cette phosphorylation de p38 coïncide avec la phosphorylation de sa cible, ATF2, qui est détectable à partir de 30 minutes et jusqu'à 4h post-irradiation (**fig.7A**). La voie p38 semble donc activée par l'irradiation, et fonctionnelle.

## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire



**Figure 7:** L'irradiation active la voie p38 dans les cellules HMEC-1.

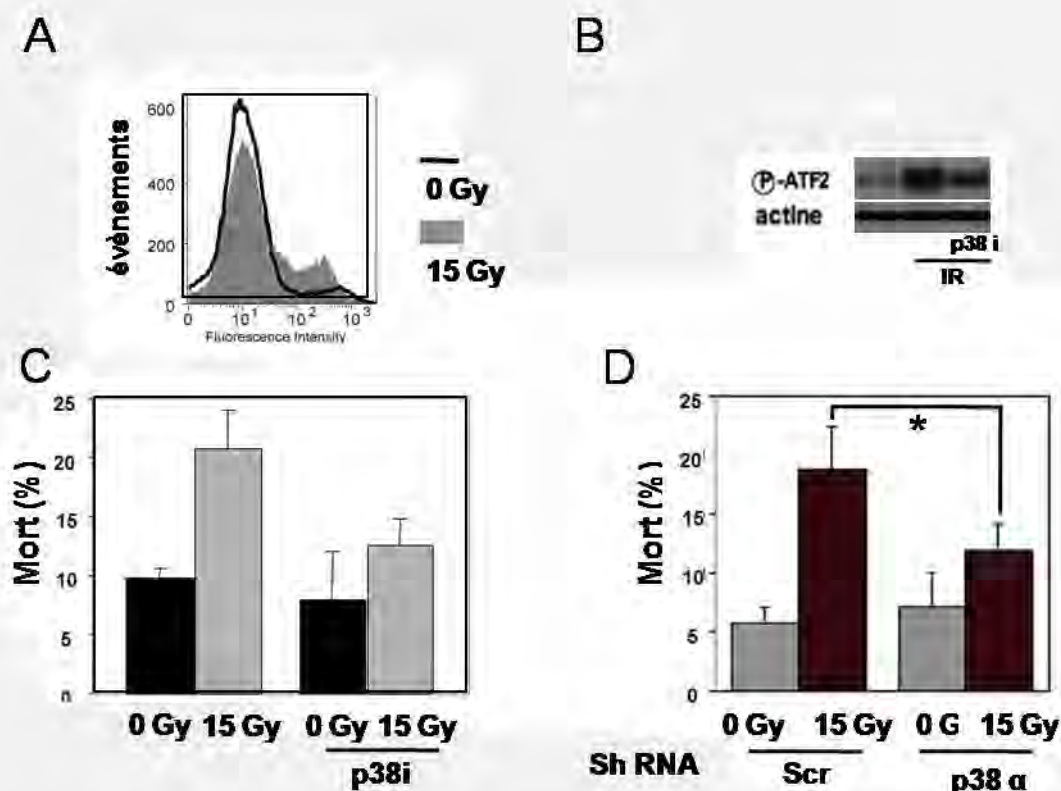
- A. Western blot évaluant la phosphorylation de p38 et ATF2 vis-à-vis de p38 total et de l'actine, respectivement, dans les cellules HMEC-1 irradiées à 15 Gy.
- B. Marquage immunocytologique de p38, phosphorylé ou total (rouge) dans les cellules HMEC-1 15 min après irradiation (microscope à fluorescence Apotome - bleu: noyau/contre-marquage nucléaire Hoechst - grossissement x 200).

Enfin, pour étudier l'impact de cette voie p38 radioinduite sur la vague d'apoptose que subissent les cellules HMEC-1 24h après irradiation (**fig.8A**), nous avons bloqué cette voie par deux approches :

- en bloquant la voie via un inhibiteur pharmacologique (le MAPIII kinase inhibiteur (Calbiochem), ou « p38i »)
- en transduisant les cellules avec un lentivirus exprimant un shRNA ciblant p38 $\alpha$

Ces deux approches bloquent la voie p38 : p38i diminue la phosphorylation d'ATF2 radioinduite (**fig.8B**), et l'augmentation de phospho-p38 30 minutes après irradiation semble fortement inhibée dans les cellules HMEC-1 exprimant le sh p38 $\alpha$  (données préliminaires non montrées). Dans les deux cas, l'inhibition de p38 atténue fortement l'apoptose radioinduite, 24h après irradiation (indice de mort : 20.70% +/- 5.7 à 15 Gy contre 12.51% +/- 3.9 à 15 Gy avec pré-traitement en p38i, en comptage, mais différence non significative, **fig.8C** pour l'inhibiteur de p38 ; et 18.6% +/- 2.1 contre 11.7% +/- 1.3 en Apo2.7 pour le sh p38  $\alpha$ , **fig.8D**).

## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire



**Figure 8: La voie p38 est un relais majeur du signal pro-apoptotique déclenché par l'irradiation dans les cellules microvasculaires.**

- A. Détermination par cytométrie en flux du nombre de cellules HMEC-1 en apoptose par marquage Apo2.7, 24h après irradiation à 15 Gy. Résultat représentatif tiré de six expériences réalisées en triplicate.
- B. Western blot évaluant la phosphorylation d'ATF2 vis-à-vis de l'actine, dans les cellules HMEC-1 30 minutes après une irradiation (IR) à 15 Gy suivant un traitement par l'inhibiteur de la voie p38 (p38i, 20  $\mu$ M)
- C,D. Indice de mort établi par comptage, 24h après irradiation des cellules HMEC-1, traitées par l'inhibiteur de p38 (p38i, C.), ou exprimant de façon stable un sh RNA contrôle (scr) ou un shRNA ciblant p38 $\alpha$  (p38 $\alpha$ ) (D). (moyenne  $\pm$  E.T. d'une expérience réalisée en triplicate et de 3 expériences indépendantes réalisées en duplicate, respectivement) (\*  $P \leq 0.05$ )

Nos résultats valident l'activation pharmacologique et radioinduite de la voie pro-apoptotique p38 dans notre modèle de cellules HMEC-1, conformément aux résultats basés sur les cellules primaires (Kumar *et al.*, 2004).

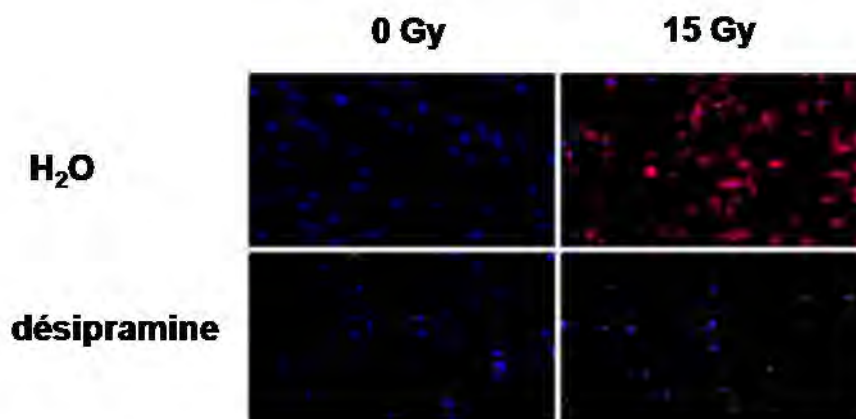
- L'IR forte dose déclenche une voie commune ASM/céramide/p38 (le couple ASM/céramide contrôle l'induction de la voie apoptotique p38)



## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire

Nous avons validé dans notre modèle l'activation par une irradiation unique forte dose des 2 voies pro-apoptotiques canoniques, dans les cellules endothéliales : la voie de la sphingomyélinase acide et la voie de la MAPK p38. Cette mise en évidence des deux voies dans un même modèle offre la possibilité d'étudier leur éventuel couplage.

Une forte inhibition de la phosphorylation de p38 est observée si les cellules HMEC-1 sont traitées à la désipramine avant irradiation (**fig.9**). Ainsi, bloquer l'activation de la sphingomyélinase acide empêche le déclenchement de la voie p38.

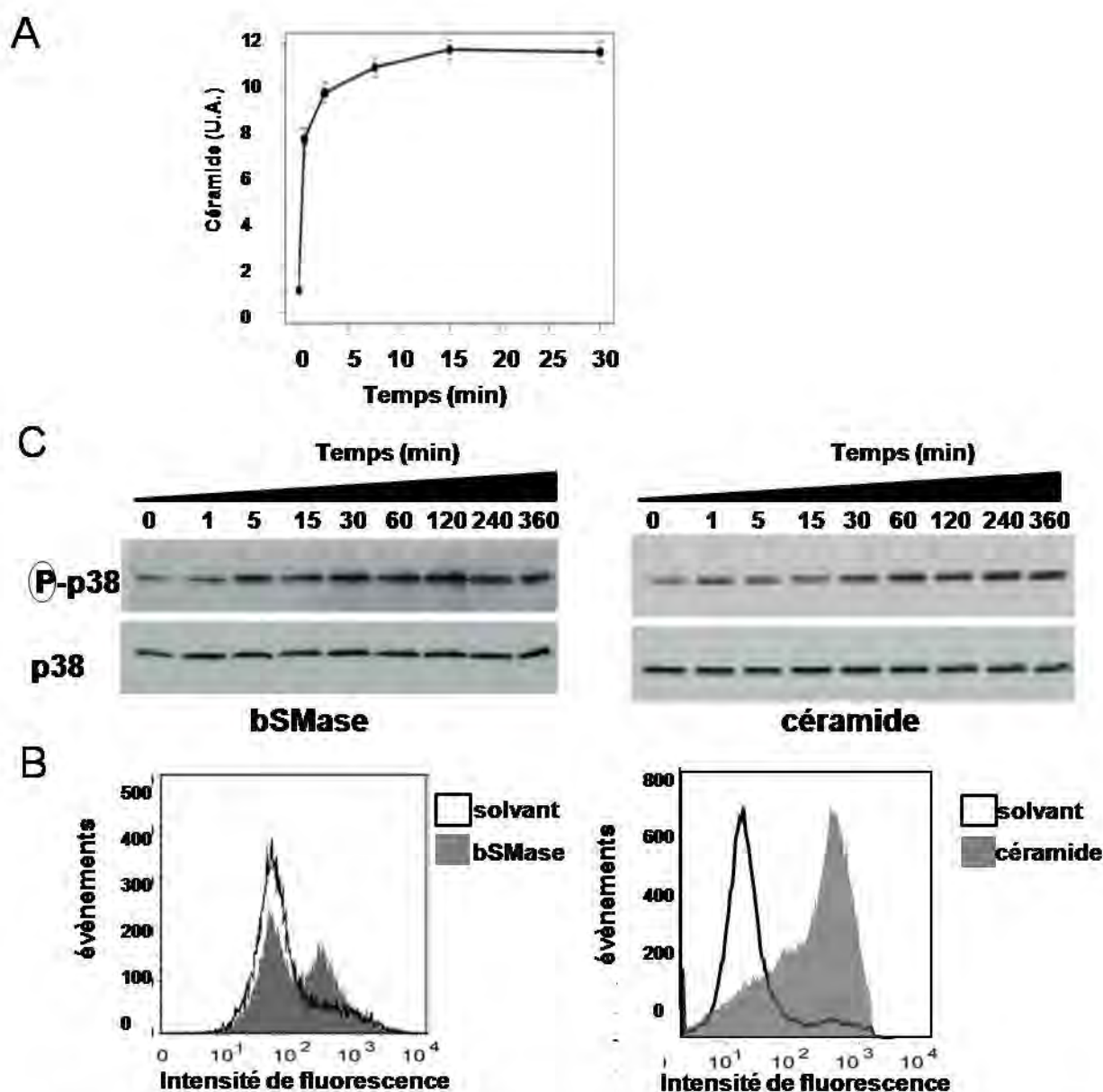


**Figure 9:** La sphingomyélinase acide contrôle l'activation radioinduite de la voie p38.

Marquage immunocytologique du phospho-p38 (rouge) dans les cellules HMEC-1, traitées ou non à la désipramine, 30 min. après irradiation. (microscope à fluorescence Apotome - bleu: noyau/contre-marquage nucléaire Hoechst - grossissement x 100).

Réciproquement, on observe que le céramide exogène à longue chaîne carbonée (C16, 1  $\mu$ M) comme la sphingomyélinase bactérienne (1 U/ml) provoquent une phosphorylation de p38 proportionnelle au temps d'exposition des cellules HMEC-1 (**fig.10C** et **D** respectivement), corrélée avec la vague d'apoptose déclenchée à 24h. par les deux agents (**fig. 10B**). La fonctionnalité de la sphingomyélinase bactérienne sur les cellules HMEC-1 a été vérifiée par essai DAG-kinase (**fig.10A**).

## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire



**Figure 10:** L'activation de p38 et l'apoptose radioinduites peuvent être mimées par la sphingomyélinase et le céramide exogènes.

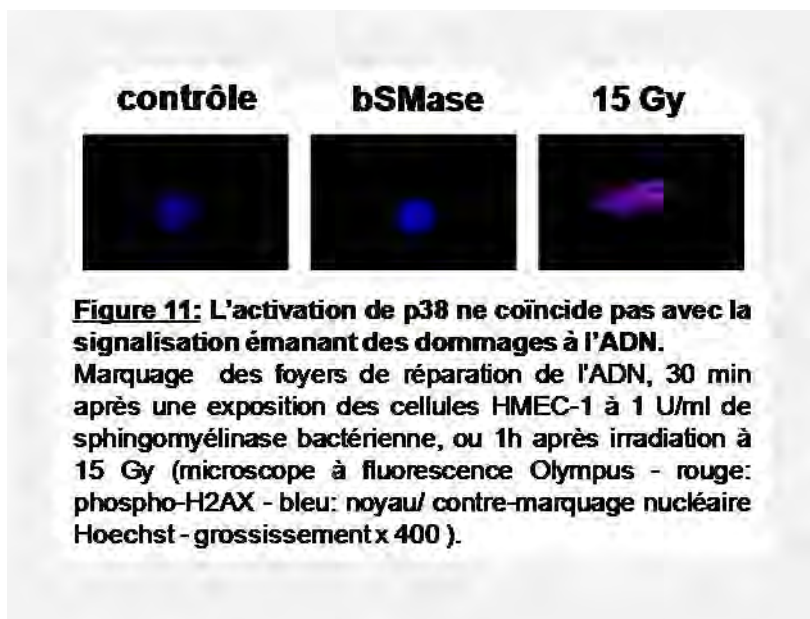
A. Le contenu en céramide des cellules HMEC1 a été évalué par essai DAG kinase, à différents temps suivants un traitement par 1 U/ml de sphingomyélinase bactérienne. Les valeurs représentent la moyenne +/- E.T. de deux expériences indépendantes réalisées en triplicate ( $P \leq 0.05$ )

B. Western blot étudiant la phosphorylation de p38 vis-à-vis de p38 total dans les cellules HMEC-1 par 1 U/ml de sphingomyélinase bactérienne, ( ) ou 1  $\mu$ M de céramide ( ).

C. Quantification de l'apoptose par cytométrie en flux après marquage Apo2.7, 24h après traitement par 1 U/ml de sphingomyélinase bactérienne (gauche) ou 1  $\mu$ M de céramide (droite). Figure représentative de trois expériences réalisées en triplicate.

## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire

A l'inverse, la sphingomyélinase bactérienne ne génère aucun marquage H2AX, qui caractérise la présence de dommages à l'ADN, largement impliqués dans la littérature dans l'activation nucléaire de p38 (fig.11).



Ainsi, les deux voies, céramide et p38, sont couplées, et le céramide contrôle l'activation de la voie p38, un résultat proche de celui obtenu dans les cellules de macrovaisseaux, où le couple sphingomyélinase acide/céramide module l'activation de la voie Jnk (Verheij *et al.*, 1996). Le mécanisme d'activation de p38 semble indépendant des dommages à l'ADN.

### 2) Le couple ASM/céramide, activé par l'irradiation, agit en modulant l'organisation membranaire des cellules microvasculaires :

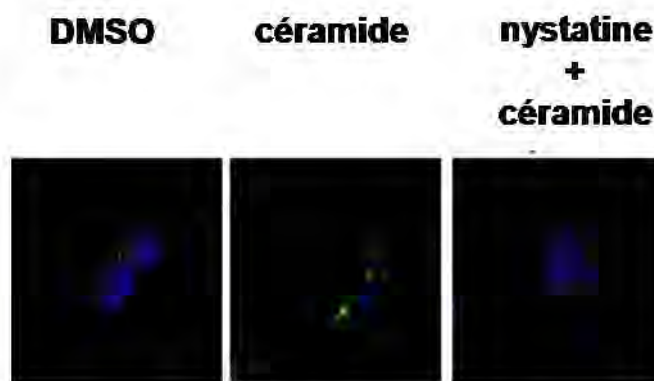
1. L'irradiation provoque l'externalisation de la sphingomyélinase acide et le remodelage membranaire

Parallèlement aux travaux établissant le rôle central joué par la sphingomyélinase acide dans l'endothélium microvasculaire irradié, les travaux des équipes Kolesnick et Gulbins ont défini un mode d'action du couple ASM/céramide passant par un certain nombre d'étapes définies, principalement dans des modèles lymphoïdes et épithéliaux, sous l'action de récepteurs de la famille du TNF ou de parasites (Gulbins et Kolesnick, 2003). Nous souhaitons déterminer si l'engagement du couple ASM/céramide par l'IR forte dose coïncide avec un tel modèle.

Dans un premier temps, nous avons observé la ségrégation d'une toxine cholérique couplée à un fluorophore sur les cellules HMEC-1 traitées par du céramide exogène ou de la sphingomyélinase bactérienne. La répartition du marqueur GM1, associé aux radeaux lipidiques, est profondément altérée par la présence du céramide, passant d'une distribution diffuse à une concentration du marqueur en quelques larges zones (fig.12).

## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire

---

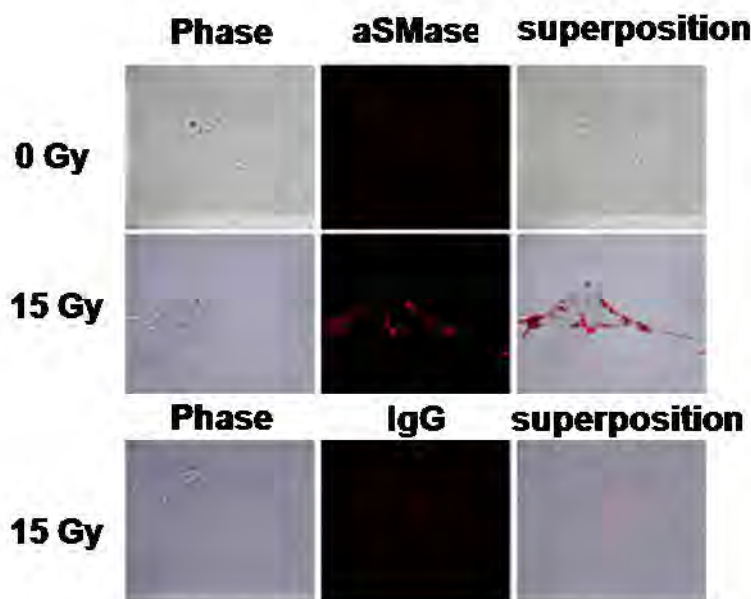


**Figure 12:** Le céramide provoque l'agrégation des rafts en de larges plateformes.

Répartition du marqueur de radeaux lipidiques, GM1, visualisé par marquage des cellules HMEC1 avec la sous-unité  $\beta$  de la toxine cholérique couplée à la FITC. Les cellules, éventuellement traitées avec le chélateur de cholestérol nystatine, ont ensuite été exposées 1h. à 1  $\mu$ M de céramide. (microscope confocal - vert: CTX-FITC – contre-nucléaire: Drack-5 - grossissement x 400).

Le couple sphingomyélinase/céramide induit donc, au moins en tant qu'agent pharmacologique, un profond remodelage membranaire, reposant sur l'agrégation des rafts en « plateformes lipidiques », dans les cellules microvasculaires. Nous avons ensuite évalué si l'engagement du couple sphingomyélinase acide/céramide dans les cellules microvasculaires conduisait à un remodelage membranaire : dans un premier temps, nous avons observé que, 15 minutes après une irradiation à 15 Gy, la sphingomyélinase acide est détectable sur des cellules HMEC-1 non perméabilisées (**fig.13**). Ce résultat indique une relocalisation de l'enzyme depuis les stocks intracellulaires vers le feuillet externe de la membrane plasmique, une caractéristique du modèle établi par Gulbins et Kolesnick.

## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire



**Figure 13:** L'irradiation entraîne l'externalisation de la sphingomyélinase acide.

Localisation de la sphingomyélinase dans les cellules HMEC1 non perméabilisées, 15 min après irradiation à 15 Gy (colonne de gauche: photographies en contraste de phase, colonne centrale: microscope Apotome avec marquage de la sphingomyélinase acide, colonne de droite: superposition des deux acquisitions - grossissement x 630 ).

Ensuite, nous avons étudié la distribution du marqueur GM1 après irradiation des cellules HMEC-1 : l'irradiation aboutit, en 30 minutes, à une redistribution du marqueur GM1 en de larges structures discrètes au niveau de la membrane plasmique (**fig.14**). Cette redistribution est abolie si l'on prétraite les cellules HMEC-1 avant irradiation avec :

- la nystatine, qui se complexe au cholestérol et empêche tout remodelage membranaire
- la désipramine, inhibiteur de la sphingomyélinase acide (**fig.14**)

## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire

---



**Figure 14:** L'irradiation provoque l'agrégation des rafts en de larges plateformes.

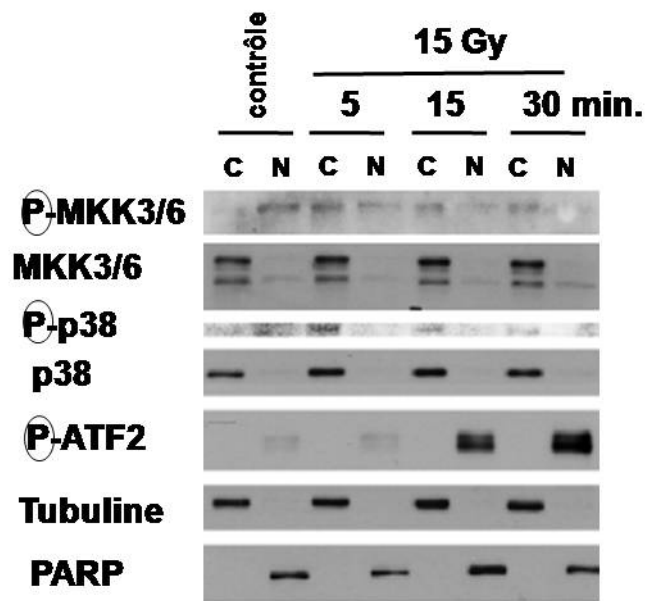
Répartition du marqueur de radeaux lipidiques, GM1, visualisé par marquage des cellules HMEC1 avec la sous-unité  $\beta$  de la toxine cholérique couplée à la FITC, 30 min après irradiation à 15 Gy. Les cellules ont été éventuellement prétraitées avec l'inhibiteur de la sphingomyélinase acide, la désipramine, ou le chélateur de cholestérol, la nystatine. (photographies de microscope confocal - vert CTX-FITC - bleu: contre-marquage nucléaire Drack-5 - grossissement x 400).

2. Le remodelage membranaire radioinduit gouverne l'induction de la voie apoptotique p38

Nos résultats montrent donc que l'irradiation déclenche, dans les cellules microvasculaires, une cascade menant du couple sphingomyélinase acide/céramide à la voie pro-apoptotique p38, et que simultanément, l'activation du couple sphingomyélinase acide/céramide provoque une coalescence des rafts en de larges plateformes. Nous avons donc cherché à évaluer si l'activation de p38 intervenait indépendamment du remodelage membranaire déclenché par le céramide.

Dans un premier temps, nous avons étudié la localisation de quatre acteurs clés de la voie de transduction de p38 : ses activateurs, les MAP2K MKK3 et MKK6, p38 lui-même, et sa cible ATF2, après un fractionnement séparant le noyau du cytoplasme et des fractions membranaires associées. On observe que les activateurs amont de p38, comme p38 lui-même, sont localisés essentiellement dans le cytoplasme, et qu'après irradiation les formes phosphorylées sont également essentiellement non-nucléaires, à la différence de la cible de p38, ATF2, dont la phosphorylation n'est pas immédiate, et qui se localise dans la fraction nucléaire (**fig.15**). Il semble donc que l'activation de p38 survienne dans le cytoplasme.

## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire



**Figure 15:** Le module p38 est activé dans le cytoplasme.

Western blot étudiant la phosphorylation de MKK3/6, p38 et ATF2 vis-à-vis de MKK3/6 total, p38 total et de l'actine, respectivement, dans les fractions cytoplasmiques (C) et nucléaires (N) de cellules HMEC-1 irradiées à 15 Gy.

Cette observation est étayée par un co-marquage entre le phospho-p38 et le ganglioside GM1, réalisé 30 minutes après irradiation, et qui montre que la forme phosphorylée se concentre sur des portions discrètes de la membrane plasmique, qui correspondent aux zones de coalescence des rafts (fig.16).

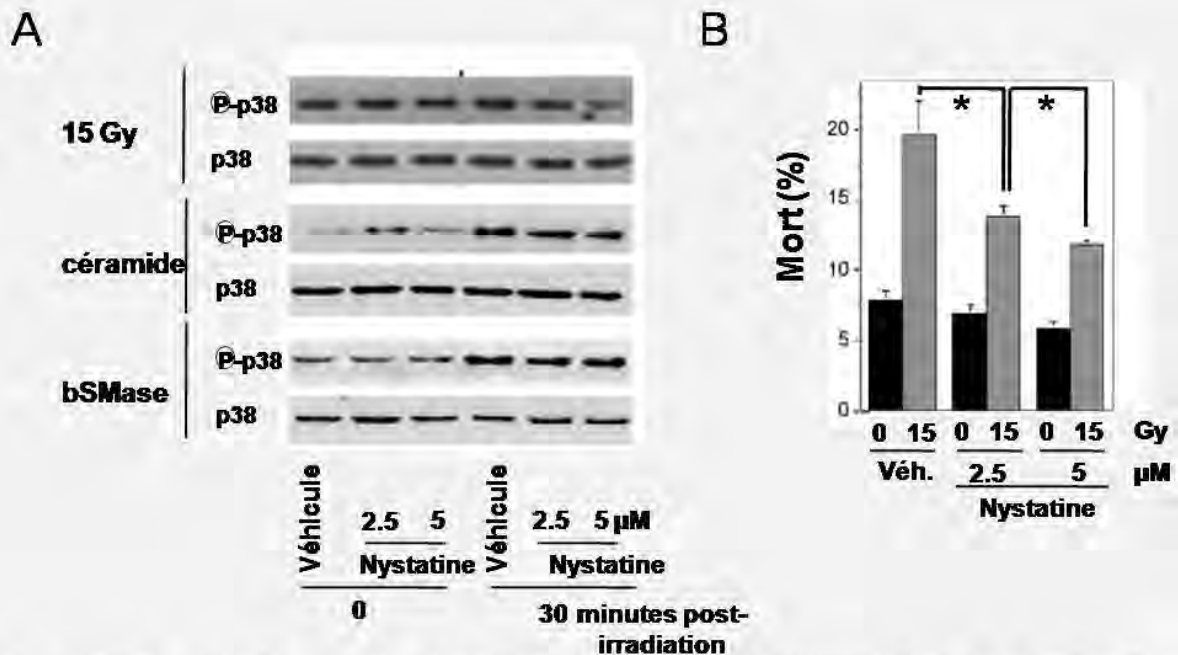


**Figure 16:** La forme activée de p38 est colocalisée avec les grandes plates-formes lipidiques radioinduites.

Répartition de la forme phosphorylée de p38 (rouge, 1ère photographie), du marqueur de radeaux lipidiques GM1, visualisé via la sous-unité  $\beta$  de la toxine cholérique couplée à la FITC (vert, 2<sup>ème</sup> photographie), du contre marquage nucléaire (bleu Dapi, 3<sup>ème</sup> photographie) et superposition des trois clichés (4<sup>ème</sup> cliché), 30 min après irradiation à 15 Gy (photographies de microscope confocal Apotome - grossissement x 630).

Enfin, si l'on empêche l'agrégation des rafts en traitant les cellules avant irradiation par la nystatine, on observe une forte réduction de la phosphorylation radioinduite (fig.17A), à laquelle correspond une protection de la mort radioinduite à 24h (indice de mort : 19.6% +/- 1.4 en irradiation contre 12.7% +/- 0.2 en irradiation précédée d'une exposition à la nystatine, fig.17B).

## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire



**Figure 17: Empêcher l'agrégation des rafts protège les cellules HMEC-1 de l'activation de p38 et de la mort radioinduites.**

A. Western blot étudiant la phosphorylation de p38 vis-à-vis de p38 total dans les cellules HMEC-1 pré-traitées avec deux doses de nystatine puis irradiées à 15 Gy.

B. Indice de mort établi par marquage Apo2.7, 24 h. après irradiation à 15 Gy des cellules HMEC-1, pré-traitées avec deux doses de nystatine.

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes réalisées en triplicate (\* $P < 0.05$ )

Nos résultats indiquent une localisation restreinte des acteurs de la voie p38 au niveau de la membrane plasmique et du cytoplasme, qui plaide en faveur d'une activation localisée de la voie suite à l'irradiation. La coalescence des rafts provoquée par le céramide radioinduit semble être l'évènement critique dans cette activation membranaire de p38, qui survient indépendamment des dommages de l'ADN.

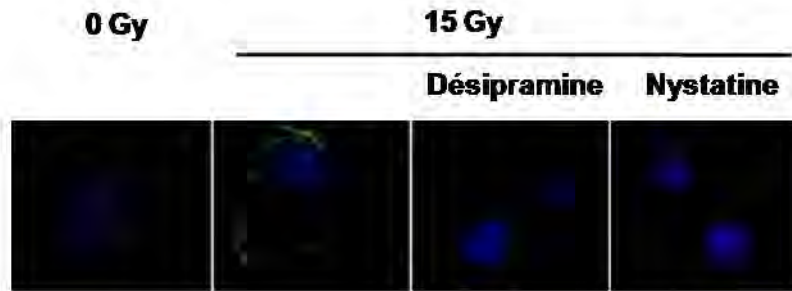
3. L'IR active également la voie ASM/céramide/p38 dans les cellules primaires et les tissus

Ayant tiré parti d'un modèle de lignée microvasculaire pour démontrer une séquence d'évènements contrôlant l'apoptose précoce des cellules endothéliales, nous avons cherché à en valider les points clés en cellules primaires puis au niveau tissulaire.

Nous observons en effet qu'une irradiation à 15 Gy de cellules microvasculaires primaires HMVECs entraîne en 30 minutes la formation de larges plateformes en surface des cellules, contenant le marqueur GM1 (fig.18). Cette coalescence est inhibée par la nystatine, confirmant qu'il s'agit là d'une agrégation de rafts, et par la désipramine, conformément au modèle établi dans les cellules HMEC-1 et montrant l'engagement radioinduit de la sphingomyélinase acide suivie d'un remodelage membranaire.



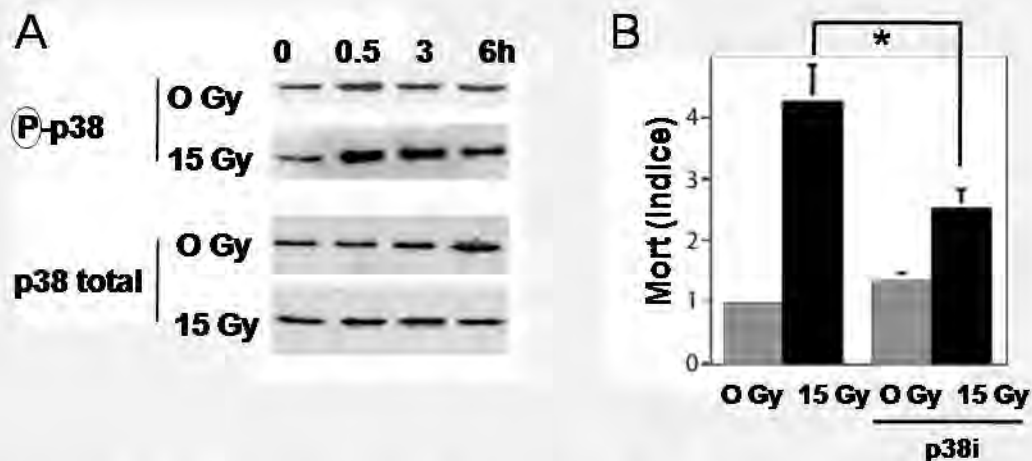
## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire



**Figure 18:** L'irradiation provoque l'agrégation des rafts en de larges plateformes à la surface des cellules vasculaires primaires.

Répartition du marqueur de radeaux lipidiques, GM1, visualisé par marquage des cellules HMVEC avec la sous-unité  $\beta$  de la toxine cholérique couplée à la FITC, 30 min après irradiation à 15 Gy. Les cellules ont été éventuellement prétraitées avec l'inhibiteur de la sphingomyélinase acide, la désipramine, ou le chélateur de cholestérol, la nystatine. (photographies de microscope confocal - vert CTX-FITC - bleu: contre-marquage nucléaire Drack-5 - grossissement x 400).

L'irradiation déclenche également la voie de mort p38 dans ces cellules primaires, comme le montrent la phosphorylation rapide survenant après irradiation (fig.19A), et la protection apportée par l'inhibiteur de p38, qui protège à plus de 40% les cellules de la vague d'apoptose se déclenchant dans les cellules 24h après irradiation (fig.19B).



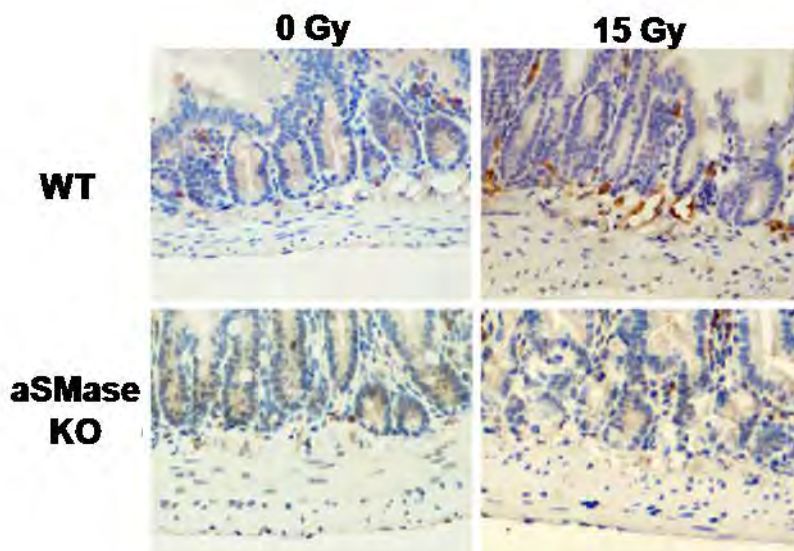
**Figure 19:** La voie p38 est un relais majeur du signal pro-apoptotique déclenché par l'irradiation dans les cellules microvasculaires primaires.

A. Western blot étudiant la phosphorylation de p38 vis-à-vis de p38 total dans les cellules HMVEC-1 irradiées à 15 Gy.

B. Indice de mort établi par comptage, 24 h. après irradiation à 15 Gy des cellules HMVEC, pré-traitées avec 20  $\mu$ M d'inhibiteur MAP3K. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  E.T. de deux expériences indépendantes réalisées en duplicate (\* $P \leq 0.05$ ).

## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire

Enfin, la forme phosphorylée de p38 est détectable dans la lamina propria intestinale de souris C57/Bl6 soumises à une irradiation corporelle totale à une dose de 15 Gy, 30 min après irradiation. Ce marquage est absent des souris dans lesquelles le gène de la sphingomyélinase acide est invalidé (fig.20).



**Figure 20:** La voie sphingomyélinase acide/p38 est également activée par l'irradiation *in vivo*.

Coupes histologiques de jejunum proximal de souris C57/Bl6, invalidées (aSMase KO) ou non (WT) pour la sphingomyélinase acide, 30 min après irradiation corporelle totale à 15 Gy. (coloration: bleue, hématoxyline et noire, anti-phospho-p38 révélé par la peroxydase).

Ces résultats préliminaires valident la connexion acide sphingomyélinase/p38 *in vivo* (même si des expériences complémentaires, en particulier un co-marquage CD31 identifiant les cellules endothéliales, sont nécessaires).

Ces résultats démontrent que les principales étapes constituant la séquence, menant de l'irradiation forte dose à l'apoptose des cellules microvasculaires, sont détectables dans les cellules endothéliales primaires : coalescence des rafts contrôlée par la sphingomyélinase acide, activation de la voie de mort p38. En outre, nous démontrons que le signal p38 est bien activé *in vivo*, et abrogé par la suppression de la sphingomyélinase acide, qui coïncide avec une protection des cryptes et une abrogation du syndrome gastro-intestinal (Paris *et al.*, 2001a).

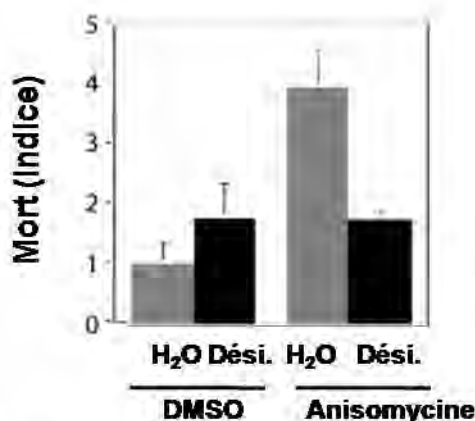
### 3) Les ROS, intermédiaires entre IR et ASM, suggèrent un mécanisme s'élargissant/applicable aux agents chimiothérapeutiques

1. L'irradiation active le couple ASM/céramide via les ROS

## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire

Si l'impact du couple sphingomyélinase acide/céramide sur le remodelage membranaire a été démontré dans des types cellulaires variés, les événements initiant l'externalisation de la sphingomyélinase acide ne sont pas élucidés. Disposer d'un nouveau modèle d'engagement de la voie du céramide nous offre l'opportunité d'en obtenir un certain nombre d'éléments nouveaux sur les mécanismes d'engagement de la sphingomyélinase acide.

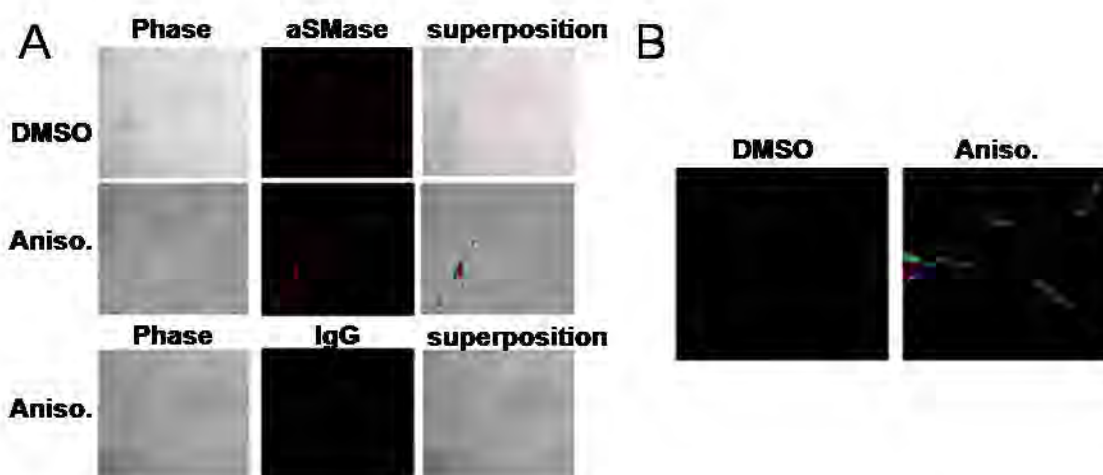
Le premier résultat en ce sens a été fourni par une observation inattendue : l'anisomycine, utilisée comme activateur de la voie p38, voit son action pro-apoptotique fortement atténuée par l'inhibiteur de la sphingomyélinase acide, la désipramine (**fig.21**).



**Figure 21:** La sphingomyélinase acide contrôle également l'apoptose des cellules microvasculaires induite par l'anisomycine. Indice de mort établi par comptage, 24 h. après traitement des cellules HMEC-1, avec une combinaison de 50  $\mu$ M de désipramine et de 4  $\mu$ M d'anisomycine. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  E.T. d'une expérience réalisée en triplicate ( $P \leq 0.05$ ).

Nous nous sommes donc penchés sur le degré d'interaction entre anisomycine et voie de la sphingomyélinase acide, et avons successivement mis en évidence un engagement par l'anisomycine de toutes les étapes de la séquence déclenchée par l'irradiation : externalisation rapide de la sphingomyélinase acide (5 min, **fig.22A**), induction de la coalescence des rafts (15', **fig.22B**) sont d'abord détectées.

## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire

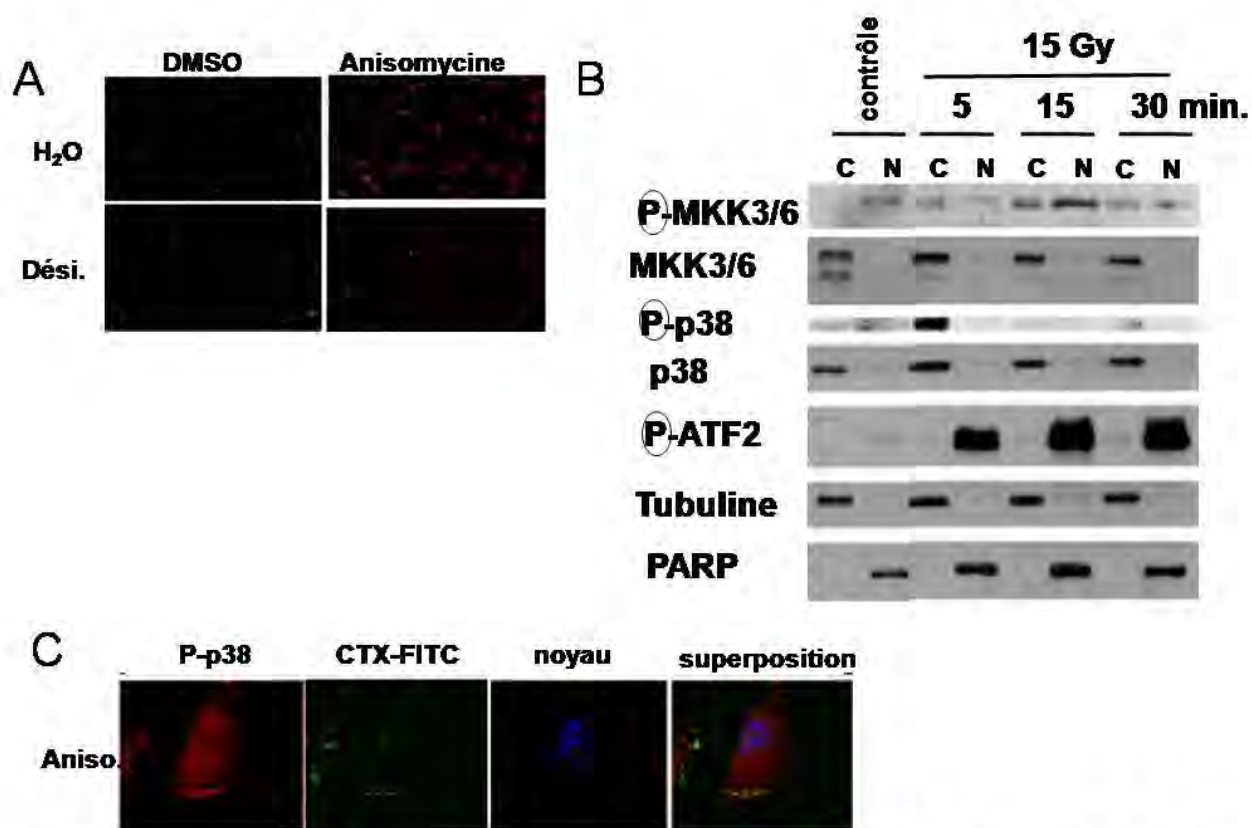


**Figure 22:** L'anisomycine déclenche l'externalisation de la sphingomyélinase acide et le remodelage membranaire dans les cellules HMEC-1.

- A. Localisation de la sphingomyélinase dans les cellules HMEC1 non perméabilisées, 5 min après traitement par 4  $\mu$ M d'anisomycine (colonne de gauche: photographies en contraste de phase, colonne centrale: microscopie confocale avec marquage de la sphingomyélinase acide, colonne de droite: superposition des deux acquisitions - grossissement x 630).
- B. Répartition du marqueur de radeaux lipidiques, GM1, visualisé par marquage des cellules HMEC1 avec la sous-unité  $\beta$  de la toxine cholérique couplée à la FITC, 15 min après traitement (photographies de microscope confocal - vert: CTX-FITC - bleu: contre-marquage nucléaire Drack-5 - grossissement x 400).

L'activation de p38 via la sphingomyélinase acide (**fig.23A**), la présence des activateurs amont de p38 dans le cytoplasme (**fig.23B**) et la colocalisation entre forme phosphorylée de p38 et zones de coalescence des rafts (**fig.23C**) sont également mises en évidence.

## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire



**Figure 23:** L'anisomycine reproduit la séquence d'évènements menant à l'activation de la voie p38 dans les cellules HMEC-1.

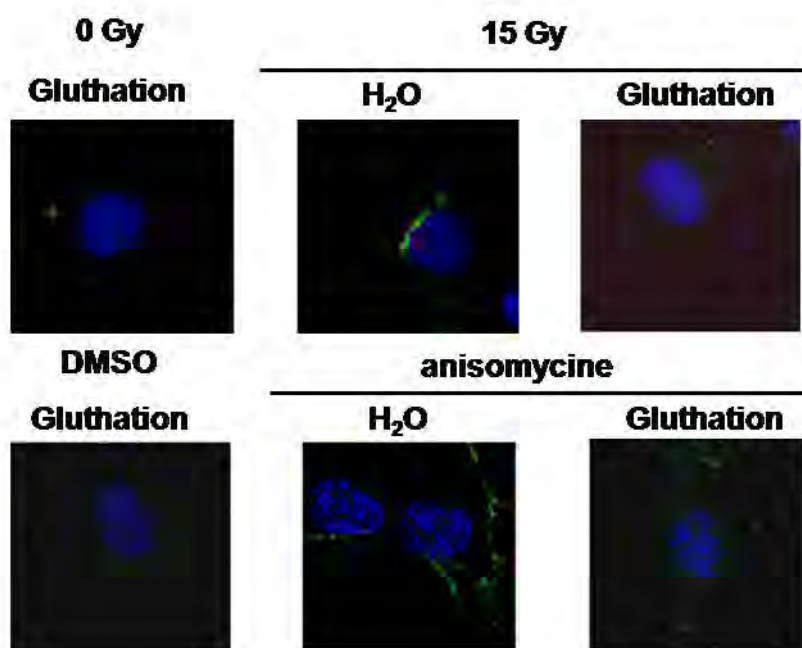
- A. Marquage par immunofluorescence du phospho-p38, 15 min après traitement des cellules HMEC-1, avec une combinaison de 50  $\mu$ M de désipramine et de 4  $\mu$ M d'anisomycine (photographies de microscope à fluorescence- rouge: phospho-p38, bleu: noyau/ contre-marquage nucléaire Hoechst-grossissement x 100)
- B. Western blot étudiant la phosphorylation de MKK3/6, p38 et ATF2 vis-à-vis de MKK3/6 total, p38 total et de l'actine, respectivement, dans les fractions cytoplasmiques (C) et nucléaires (N) de cellules HMEC-1 irradiées à 15 Gy.
- C. Répartition de la forme phosphorylée de p38 (rouge, 1ère photographie), du marqueur de radeaux lipidiques GM1, visualisé via la sous-unité  $\beta$  de la toxine cholérique couplée à la FITC (vert, 2<sup>ème</sup> photographie), du contre marquage nucléaire (Dapi,bleu, 3<sup>ème</sup> photographie) et superposition des trois clichés (4<sup>ème</sup> cliché), 15 min après traitement des cellules HMEC-1 par 4  $\mu$ M d'anisomycine (photographies de microscope confocal Apotome- grossissement x 630 ).

Il semble donc que l'anisomycine active, par un mécanisme partagé avec l'irradiation, l'externalisation de la sphingomyélinase acide et ensuite l'ensemble de la séquence menant à la mort médiée par p38. En revenant à l'effet fondamental des rayons dans les cellules, la génération ultra-rapide d'espèces activées de l'oxygène, nous avons constaté que l'anisomycine était également décrite comme capable de générer de telles espèces (Törocsik & Szeberényi, 2000).

Nous avons donc évalué un éventuel rôle des espèces radicalaires comme signal amont déclenché par l'irradiation, et également par l'anisomycine. Nous avons incubé les cellules avec le glutathion, un agent antioxydant, avant de les soumettre à une irradiation de 15 Gy ou à une dose de 4  $\mu$ M d'anisomycine. Nous avons dans les deux cas constaté que l'agrégation des rafts est abolie par le glutathion, indiquant que cet évènement est déclenché par les espèces activées de l'oxygène lorsque les cellules sont exposées à l'irradiation, tout comme à l'anisomycine (fig.24).

## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire

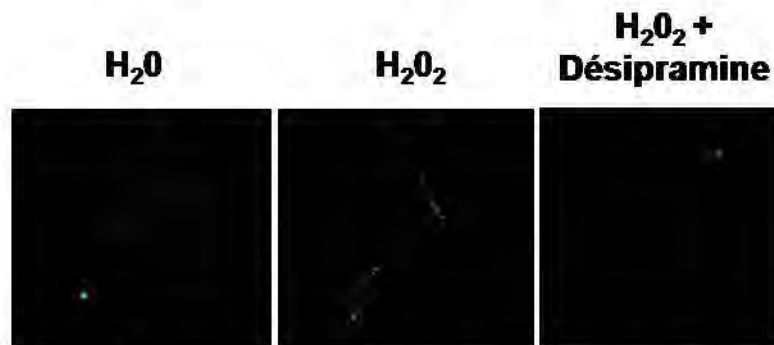
---



**Figure 24:** Le glutathion empêche le remodelage membranaire induit par l'irradiation et l'anisomycine. Répartition de marqueur de radeaux lipidiques, GM1, visualisé par marquage des cellules HMEC1 avec la sous-unité  $\beta$  de la toxine cholérique couplée à la FITC, 15 min après traitement par une combinaison de 2  $\mu\text{M}$  de glutathion et 4  $\mu\text{M}$  d'anisomycine (photographies de microscope confocal - vert: CTX-FITC - bleu: contre-marquage nucléaire Drack-5 - grossissement x 400 )

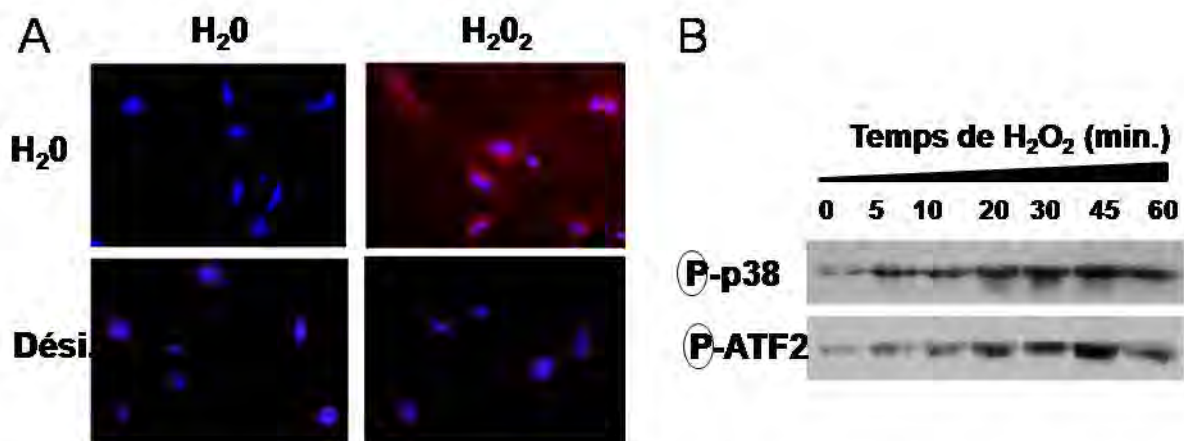
Inversement, si on produit de façon pharmacologique des espèces activées de l'oxygène dans les cellules, en les exposant au peroxyde d'hydrogène, on constate qu'une dose de 5  $\mu\text{M}$  induit un remodelage membranaire comparable à celui entraîné par l'irradiation. Ce remodelage est inhibé par la désipramine, ce qui suggère que les espèces radicalaires puissent constituer un des tout premiers relais moléculaires de l'irradiation (fig.25).

## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire



**Figure 25:** La génération d'espèces radicalaires induit le remodelage membranaire. Répartition du marqueur de radeaux lipidiques GM1, visualisé via la sous-unité  $\beta$  de la toxine cholérique couplée à la FITC (vert) 5 min après exposition à 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (photographies de microscope confocal Apotome - grossissement x 630).

Conformément à la cascade définie pour l'irradiation et l'anisomyine, on constate que la génération d'espèces radicalaires entraîne la phosphorylation rapide de p38 en western blot (données préliminaires, **fig.26A**) et en immunofluorescence (**fig.26B**), et que cette phosphorylation de p38 n'est possible que si la sphingomyélinase acide est active (**fig.25B**).

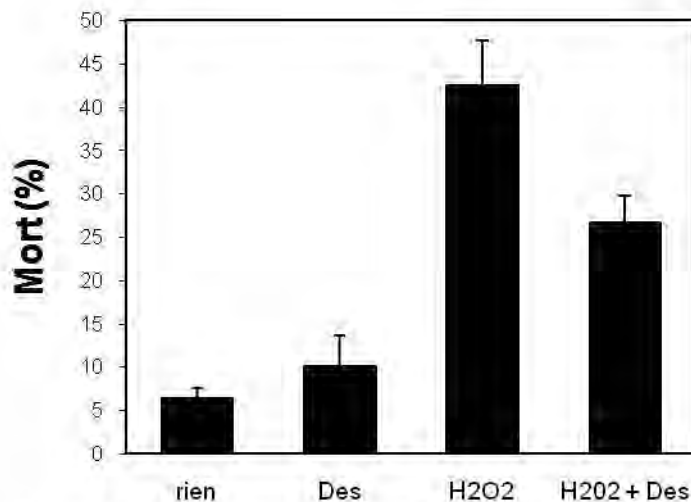


**Figure 26:** La génération d'espèces radicalaires entraîne l'activation de la voie p38

- A. Marquage par immunofluorescence du phospho-p38, 5 min après traitement des cellules HMEC-1, par une combinaison de 50  $\mu\text{M}$  de désipramine et de 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (photographies de microscopie confocale - rouge: phospho-p38 - bleu: noyau/ contre-marquage nucléaire Hoechst - grossissement x 200)
- B. Western blot évaluant la phosphorylation de p38 et ATF2 dans les cellules HMEC1 traitées avec une dose de 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire

Enfin, le peroxyde d'hydrogène entraîne une cascade de mort, et de façon cohérente avec son inhibition du remodelage membranaire et de l'induction de la voie de mort p38, la désipramine protège partiellement les cellules endothéliales des espèces radicalaires (fig.27).



**Figure 27:** La désipramine protège partiellement de la mort induite par le peroxyde d'hydrogène. Indice de mort établi par comptage, 24 h. après traitement des cellules HMEC-1, avec une combinaison de 50  $\mu\text{M}$  de désipramine et de 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  E.T. (n=1).

Collectivement, ces résultats indiquent que l'irradiation est très certainement capable d'induire une externalisation massive et rapide de la sphingomyélinase acide en générant des espèces radicalaires. Ceci enclenche la séquence menant à la destruction des cellules microvasculaires, et peut être mimé par l'action de l'anisomycine, qui génère des espèces radicalaires, ou par le peroxyde d'hydrogène.

2. Divers agents chimiothérapeutiques pourraient engager une réponse contrôlée par p38 dans l'endothélium microvasculaire

Pour valider ce modèle d'engagement de la mort des cellules microvasculaires par les espèces radicalaires, nous avons décidé de tirer parti de résultats répétés suggérant que certains agents génotoxiques sont capables, outre leur action sur l'ADN, de générer des espèces radicalaires. En parallèle, une première étude montre que la toxicité intestinale et thymique causée par une dose forte de cisplatine est abrogée dans les souris déficientes en acide sphingomyélinase, et en particulier l'apoptose des cellules endothéliales (Rebillard *et al.*, 2008). Ces données, combinées à nos résultats, prédisent que de tels agents devraient entraîner l'activation de la voie p38, via la sphingomyélinase acide, dans l'endothélium microvasculaire.

Nous avons donc injecté des doses importantes de cisplatine et de doxorubicine par voie – dans les souris C57/Bl6, sauvages ou invalidées génétiquement pour la sphingomyélinase acide, puis après – min, prélevé les intestins des animaux. On observe effectivement un marquage de p38 sous sa forme phosphorylée dans la lamina propria des animaux ayant reçu l'injection d'agents génotoxiques, et



# Résultats : Contrôle de la mort radioinduite de l'endothélium par le remodelage membranaire

cette induction de p38 est abrogée par l'inactivation génétique de la sphingomyélinase acide. En outre, des résultats préliminaires suggèrent que l'inactivation de la sphingomyélinase acide permet la survie des animaux exposés à une dose unique et létale de génotoxiques (données préliminaires non montrées).

Ces résultats tendraient à renforcer notre modèle d'une séquence d'évènements partant des espèces radicalaires, activant la sphingomyélinase acide puis la voie p38, qui conduit à l'apoptose des cellules microvasculaires, en substituant à l'irradiation forte dose d'autres agents génotoxiques susceptibles de générer des espèces radicalaires.

### 3. Conclusion

La réponse de l'endothélium microvasculaire à l'irradiation représente un modèle clé dans l'étude de l'engagement du couple sphingomyélinase acide / céramide. Ce dernier intervient dans de nombreux modèles de stress, évalués dans des études essentiellement cantonnées à des lignées cellulaires. Le cadre de l'endothélium microvasculaire, étudié comme cible primaire de l'irradiation unique à forte dose, fournit un modèle dans lequel l'impact tissulaire de la voie a été le plus extensivement évalué).

Nos résultats montrent que cet engagement de la sphingomyélinase acide dans les cellules microvasculaires s'inscrit totalement dans le cadre des études des équipes Kolesnick et Gulbins, qui décrivent comment la sphingomyélinase acide, après son externalisation sur le feuillet externe de la membrane plasmique, entraîne une génération de céramide localisée qui induit un profond remodelage membranaire (**Gulbins et Kolesnick, 2003**).

En outre, nous montrons que ce remodelage membranaire radioinduit initie une cascade d'évènements considérés jusqu'ici de façon disjointe : suite à l'irradiation les rafts préexistants fusionnent en de larges plateformes lipidiques, induisant l'activation de p38, et enfin une vague d'apoptose rapide dans les cellules microvasculaires. Elle fournit la première explication mécanistique aux expériences initiales réalisées par HF et al (**Haimovitz-Friedman et al., 1997**), qui ont montré que la voie de mort qui affecte les cellules microvasculaires ne trouve pas son origine dans le noyau, comme l'assument tous les modèles classiques de mort radioinduite : les signaux de mort à l'œuvre dans les cellules endothéliales irradiées sont contrôlés par des évènements membranaires, qui modulent le déclenchement d'au moins une voie, dans notre étude p38, aboutissant à l'apoptose des cellules endothéliales, montrée comme étant l'évènement critique conditionnant à la fois la survenue du syndrome gastro-intestinal ou de la défaillance pulmonaire radioinduite, et la réponse des tumeurs à l'irradiation à forte dose.

Enfin, nos résultats suggèrent que la génération rapide d'espèces radicalaires pourrait constituer l'évènement déclencheur de l'externalisation de la sphingomyélinase acide, commun à plusieurs stress capables d'activer le couple sphingomyélinase acide/ céramide.

Plusieurs questions importantes sont ouvertes par cette étude : au niveau moléculaire, comment les espèces radicalaires peuvent-elles entraîner une externalisation de la sphingomyélinase acide en quelques secondes ? A quel niveau de la cascade des MAPK p38 est-il activé, et via quel mécanisme la coalescence des rafts module-t-elle cette activation ? Au niveau tissulaire, peut-on réaliser des observations de remodelage membranaire dans les microvaisseaux, et également valider le rôle de p38 dans la mort des microvaisseaux par des approches fonctionnelles ?

Enfin, des résultats récents permettent d'envisager que certains agents chimiothérapeutiques « classiques » possèdent, outre leur cible nucléaire traditionnelle, une action au niveau de la membrane plasmique, sur le modèle du cisplatine qui engage la voie de la sphingomyélinase acide (**Lacour et al., 2004** et **Rebillard et al., 2008**). Notre modèle pourrait s'appliquer à de tels agents.

## **II. Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate**

**Pharmacological use of sphingosine-1-phosphate to enhance endothelium survival and rescue from radiation- and LPS-induced death**

**Stéphanie Bonnaud<sup>1\*</sup>, Colin Niaudet<sup>1\*</sup>, François Legoux<sup>1</sup>, Gregory Delpon<sup>2</sup>, Xavier Saulquin<sup>1</sup>, Marie-Hélène Gaugler<sup>1-3</sup>, Zvi Fuks<sup>4</sup>, Richard Kolesnick<sup>5</sup> and François Paris<sup>1,6</sup>**

<sup>1</sup>Inserm U892-Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, Université de Nantes, Nantes, France

<sup>2</sup>Service de physique médicale, CLCC Nantes-Atlantique, Saint-Herblain, France

<sup>3</sup> Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, IRSN, B.P. n°17, F-92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France

<sup>4</sup>Radiation Oncology Department, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY

<sup>5</sup>Laboratory of Signal Transduction, Sloan-Kettering Institute, New York, NY

<sup>6</sup>Service de radiothérapie, CLCC Nantes-Atlantique, Nantes, France

\* Authors equally contribute to the present manuscript

Address correspondence to: François Paris, INSERM UMR892 - Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, Institut de Recherche Thérapeutique Université de Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes, Cedex 1, France. Phone: +33 (0)2 40 28 08 03 02; Fax: +33 (0)2 28 08 02 04; e-mail: [francois.paris@inserm.fr](mailto:francois.paris@inserm.fr)

# Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

---

## Abstract

Endothelial cell apoptosis in lost of tissue integrity and death after high dose of ionizing radiation still remains controversial. Previous *in vitro* study showed that sphingosine-1-phosphate (S1P), a ceramide antagonist, can preserve endothelium from radiation-induced apoptosis. Now, we validate the pharmacological use of S1P to restrain acute organ failure in response to severe stress. By preventing endothelium collapse, retro-orbital S1P injection in mice prevented 15 Gy-induced gastrointestinal syndrome, but also LPS-induced septic shock, an another endothelium apoptosis driving pathology. We respectively defined S1P, as specific therapeutic agent by the deficiency of protective properties of related sphingolipids, LPA and dhS1P, and endothelium, as a specific therapeutic target through the lack of radioprotection by S1P of intestines epithelial cells or B and T lymphocytes. Specific properties of S1P on endothelial cell radioprotection was confirmed by pharmacological approaches using pertussis toxin and AKTinh XI, respectively decoupling Gi proteins from 7 transmembrane-domain receptors and inhibiting AKT survival factor. Both inhibitors acted *in vitro* and *in vivo* on endothelial cells and inhibit endothelial cell death and GI syndrome development. This data should pave the way of S1P as pharmacological agent preventing endothelial collapse mediated pathology.

# Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

---

## Introduction

Recent researches have shed new light on the critical role of microvasculature collapse in the tissue pathogenesis induced by genotoxic stresses, such as cisplatin (Rebillard, *Oncogene* 2008), ionizing radiation (Paris Science 2001), and by septic shock induced by lipopolysaccharide (LPS) (Haimovitz-Friedman, *J. Ex. Med.*, 1997) shiga toxin (Ray P *Pediatr Nephrol* 2001). A notable, but still controversial example is the involvement of vascular endothelial in the early response to radiation. gastrointestinal (GI) syndrome, acute side effect limiting radiotherapy efficacy, has been considered, for a long time, to be only dependent of the intestinal clonogenic compartment's dysfunction (Potten et al. *Int. J. Radio*, 1990; Potten, *Int J. Exp. Patho*, 1997). According to this single target hypothesis, irradiation at dose  $\geq 8$  Gy causes direct death of stem cells in position 4 and 5 from the base of the crypt inhibiting crypt and villae regeneration. We and others challenged this single cell target hypothesis to a more complex scenario, where microvascular endothelial apoptosis after single high dose of radiation constitute a primary lesion, leading respectively to endothelial apoptosis, stem cell dysfunction, crypt damage, villae denudation, organ failure, and death from the GI syndrome (Paris et al, *Science* 2001, Gutkov, *Science* 2008). GI syndrome was prevented when endothelial cell apoptosis was pharmacologically inhibited in mice by intravenous-injection of basic fibroblast growth factor (bFGF) prior to irradiation. Only endothelial cell and paneth cells were expressing mRNA for the four different receptors (Paris et al., *Science* 2001), proving the stem cells and epithelial cells radioprotection was indirect.

However, involvement of endothelial cell apoptosis in high dose radiation tissular response has been recently challenged. Using TUNEL assay on intestines slides from 12 Gy-irradiated mice, Schuller and coll. were only able to observe leukocytes, but not endothelial cells, in apoptosis (schuller et al, 2007).

In a second study from the same group, use of boronated liposomes, which could not diffuse into the surrounding tissues except microvasculature, allowed to investigate its role in radiation-induced acute pathology. Selective short-ranged boron neutron exposure increased the total absorbed dose in the microvasculature up to 27 Gy, whereas the dose to the intestinal crypts remained limited to 9 Gy.

## **Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate**

---

Despite the extremely high doses to the microvasculature, no GI syndrome was observed. Authors exclude damage to the intestinal microvasculature as a cause of acute intestinal pathology after radiation, regardless of by quality of the radiation source (X-rays with low LET versus neutron) and/or the technical discrepancy to revealed apoptotic cells.

Deeper molecular and pharmacological investigations will be appropriated to better define acute mechanism in intestinal pathology after ionizing radiation. Endothelial cell apoptosis is shown to under the control of the apoptotic signal of ceramide generation through hydrolysis of cell membrane sphingomyelin by acid sphingomyelinase (Zhang, Antioxid redox signal, 2007). Use of genetic acid sphingomyelinase knock-out (ASM KO) model allows the investigation of the role of ceramide in GI syndrome. After whole body exposure to 15 Gy, ASM KO mice died later than wild-type mice. Mortality delay in the transgenic mice was understood by a switch of death type from GI syndrome with small intestines necrosis to bone marrow aplasia. Furthermore, radioprotection of intestines was correlated with an inhibition of microvascular endothelial apoptosis in the lamina propria.

Outer membrane of gram-negative bacteria, lipopolysaccharide (LPS) or endotoxin is also a life-threatening event, implicating endothelial cell dysfunction. LPS is a highly proinflammatory molecule inducing direct apoptotic endothelial cell death. Endothelial may die also after LPS treatment indirectly through relarging of proapoptotic cytokines, such as  $\text{TNF}\alpha$ , by activated macrophages (West, J trauma, 2008). After LPS stress, substantial quantities of  $\text{TNF}\alpha$  is rapidly released into the blood circulation. Injection of LPS or  $\text{TNF}\alpha$ , into C57BL/6 mice induced rapid apoptosis in endothelium of intestine, lung, fat and thymus, preceding non endothelial tissue damage and death. LPS or  $\text{TNF}\alpha$  injection was followed within 1 h by tissue ceramide generation. ASM KO mice were protected from LPS-induced death. The fact that transgenic animal displayed a normal increase in serum  $\text{TNF}\alpha$ , but an inhibition of endothelium apoptosis, clearly proved the direct involvement of aSMAse/ceramide couple in the endothelial cell death.

## Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

---

S1P is produced from ceramide deacylation and phosphorylation. Both sphingolipids have opposed cell properties and represent a molecular balance, which determines the cell fate. When ceramide is a proapoptotic factor, S1P has been shown to activate survival by activating PI3K/AKT (Igarish, JBC, 2001) or PKC (Iampasso, prostaglandins leukot essent fatty acids 2001) pathways. S1P signaling may act either intracellularly through the expression of the sphingosine kinase (Xia, JBC 1999) or extracellularly, via the binding to G protein-coupled receptors (GPCRs) called S1P receptors (S1Ps) (Ansellin, Life sci, 1999). Inhibition by S1P of ceramide-induced apoptosis shown in several culture cells from different origins, such as lymphocytes or tumor cells (Cuvilier et al Nature, 1998) have been recently confirmed *in vivo* (Morita, Nature med, 2000). Exposure of C<sub>57</sub>Bl/6 mice to a single low dose of 0.1 Gy provokes almost complete destruction of the pool of oocyte-containing primordial follicles within 2 weeks and sterility in female mice (Morita, Nature med, 2000). *In vivo* administration of S1P, 2 hours prior to irradiation, protects the follicle population and preserves fertility (Paris, Nature medicine 2002).

S1P has been already demonstrated to block *in vitro* endothelial cell death induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ref), ethanol (ref) and serum deprivation (ref). Recently, we showed that S1P protects non proliferative primary HMVEC-D and transformed HMEC-1 microvascular endothelial cells from radiation-induced apoptosis (Bonnaud et al). S1P was acting directly on ceramide-mediated death, but not on radiation-induced DNA damage pathway, to protect endothelial cells from ionizing radiation stress. We proposed, in this present study, to validate exogenous S1P as of relevant therapeutic agent able to inhibit *in vivo* endothelial apoptosis-mediated pathologies, e.g GI syndrome and LPS-induced septic shock, through the promotion of endothelial cell survival. In the purpose to clarify endothelium involvement in GI syndrome, special focuses will be to determine cell types and molecular events of the survival pathway especially targeted by S1P.

# Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

---

## Materials and Methods

### *In vitro studies*

#### *Cell Lines*

Human Microvascular Endothelial Cells (HMEC-1) were kindly provided by F.J. Candal (Center for Disease Control, Atlanta, GA; Ades et al. J Invest Dermatol. 1992). HMEC-1 cells were seeded at a density of 20,000/cm<sup>2</sup> and allowed to reach subconfluence for 5 days in MCDB 131 medium (Invitrogen) supplemented with 15% heat-inactivated FCS, 10 ng/ml epidermal growth factor (Becton-Dickinson), 2 µg/ml hydrocortisone (Sigma-Aldrich), 2 mM L-glutamine (Gibco-BRL), 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Gibco-BRL), referred to as endothelial cell complete medium. Epithelial cell lines were kindly provided by M. Neunlist (Inserm UMR913). IEC-6 primary cells were respectively seeded at 2x10<sup>4</sup> and 6x10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> and cultured in DMEM 4.5 g/l glucose (Gibco-BRL) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. T84 cell line was seeded at 2x10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> and cultured in DMEM:F12 (1:1; Gibco-BRL) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin.

#### *Irradiation and drug treatment*

irradiations were carried out in a Faxitron CP160 irradiator (Faxitron X-ray Corporation, Illinois, USA) at a dose rate of 1.48 Gy/min. Two hours before irradiation, endothelial and epithelial cell medium were changed for low serum medium (for HMEC-1, MCDB 131 supplemented with 0.1 % FCS, 2 µg/ml hydrocortisone, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin; for IEC-6, DMEM 4.5 g/l glucose supplemented with 0.1% heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin for IEC-6 and for T84, DMEM:F12 (1:1) supplemented with 0.1% heat-

## Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

---

inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin for T84). The different deprived media were supplemented with different reagents. 1 µM sphingosine 1 Phosphate (Biomol), 1 µM dihydro-sphingosine 1 phosphate (Aventi Lipids), and 1 µM lipophosphatidic acid (Biomol), were dissolved in PET vehicle (5% polyethylene glycol 6000, 2.5% Ethanol, 0.8% Tween 80) vehicle. Ly294002 (Biomol) and Pertussis toxin were respectively dissolved into DMSO and distilled water.

### *Clonogenic assay*

IEC-6 and T84 intestinal epithelial cell lines were seeded in 10 mm dishes at a various density in function of the irradiation exposure, between  $2.5 \cdot 10^3$  and  $50 \cdot 10^3$  cells per dish. After 2 hours of incubation with deprived medium supplemented with/out S1P or its vehicle, cells were irradiated at a total dose between 2 and 15 Gy. Twenty-four hours and then every week after irradiation cell medium was changed to epithelial cell complete medium. Cells were cultured for 2 weeks. Visible colonies were scored after 20 min fixation with methanol and 5 min 1% crystal violet staining.

### *Cell counting assay*

At defined time after exposure to 15 Gy, endothelial and intestinal epithelial floating apoptotic cells in the cell medium were counted as previously described (Bonnaud et al., Cancer Res., 2007).

### *Detection of Apoptosis Marker APO 2.7*



## Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

---

Pooled adherent and floating cells were washed twice with PBS, and permeabilized with 100µg/ml digitonin in PBS 2.5 % FCS 20 min on ice. After incubation with monoclonal antibody (MoAb) anti-APO2.7-phycoerythrin (clone 2,7A6A3; Immunotech) for 15 min in the dark, cells were washed and resuspended in PBS. Acquisitions were performed on a FACScalibur® flowcytometer (BD Biosciences) and data were analyzed using CellQuest software (BD Biosciences).

### DVEDase assay

The DEVDase activity was determined by use of fluorescent substrates as previously described ([Edelstein et al., 1999](#)). The DEVDase assay was performed using 20–50 µl of the supernatant obtained as described above containing 50 µg total protein. Proteins from  $10^7$  cells 24 h after irradiation and treatment with S1P and/or PTx were extracted using 100µl of RIPA lysis buffer (1% NP-40, 0.5% sodium déoxycholate, 0.1% SDS, 2 mM sodium orthovanadate in PBS). 50µg of protein were diluted in 32 µl of Caspase buffer assay (Promega) completed with 2% DMSO, 10mM DTT in H<sub>2</sub>O). Mix was pre-incubated for 30 min at 37 °C before addition of the 250µM of caspase substrate Ac-DEVD-AMC in 10% DMSO. Peptide cleavage was measured every 15 min over 2 h at 25 °C using a fluorolite 1000 fluorescent plate reader (Dynatech) at an excitation wavelength of 365 nm and an emission wavelength of 465 nm. Specific caspase activity was expressed in nmol AMC released per µg of lysate protein. Results expressed the slope of in function of time (min).

### *Studies on immune cells*

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from fresh heparinized blood of healthy donors by Ficoll (LMS, Eurobio) density gradient centrifugation (Neveu et al., *Hepatology* 2008; 48: 713-722). PBMCs were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum and 1 mM L-glutamine, without IL-2. Cells were incubated during 2 h w/o 1 µM S1P, and then irradiated at

## **Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate**

---

15 Gy.  $5 \times 10^5$  cells were harvested at different time points following irradiation and stained according to standard protocols (De Rosa et al., J. immunol. 2004; 172 (3): 1637-1645) using mouse monoclonal amcyan- or pacific blue-anti-CD3 (Becton Dickinson), APC-anti-CD19, APC-CD31 (eBiosciences), FITC-Annexin V (Beckman Coulter) and 7-AAD (Becton Dickinson). Flow cytometric analyses were performed using a FACS Canto II cytometer (Becton Dickinson). Data were analyzed with FACSDiva 6.1 software (Becton Dickinson).

### *Western Blotting*

After S1P and/or PTx treatment, HMECs grown on 25 cm<sup>2</sup> flasks were quickly frozen on liquid nitrogen then proteins were extracted using a lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 2 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 0.2 μM leupeptin, 0.3 μM aprotinin). Proteins (80 μg respectively for HMEC) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis transferred to ImmobilonP membrane (Millipore). Membrane is blocked with the Western Blocking Reagent (Roche Biosciences) and hybridized with the primary antibodies overnight. Dilution of the antibodies of interest were 1/1000 for phospho-AKT (clone 9271, Cell Signaling Tech.), 1/1000 total for total AKT (clone 9272, Cell Signaling Tech.), 1/2500 for Actin (Santa Cruz Biotech.). Membrane was then hybridized with mouse anti-rabbit (Roche Biosciences) and anti-goat secondary (Jackson ImmunoRes.) antibodies were used respectively at the dilution 2 h at room temperature before revelation.

### *In vivo studies*

#### *Animals*

8 to 12 old weeks C57Bl/6 male mice (Charles River Laboratories) were housed at the animal core facility of the INSERM UMR892. This facility is approved by the French Association for Accreditation of

## **Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate**

---

Laboratory Animal Care (AFSTAL) and is maintained in accordance with the regulations and standards of the INSERM Institute and the French Department of Agriculture.

### *Irradiation protocol, Drugs delivery and Bone Marrow treatment*

Whole body irradiation (WBR) was delivered with a  $^{60}\text{Co}$  irradiator (Atomic Energy Canada Limited).

The dose rate was  $1 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Sphingosine 1 Phosphate (Biomol) dihydro-Sphingosine 1 phosphate (Aventi Lipids; USA), and Lipophosphatidic acid (Biomol) were dissolved in PET vehicle. Maximum tolerated dose (MTD) for retro-orbital injection of the different sphingolipids in mice has been defined. Then, sphingolipids at sublethal concentration were injected in mice, 30 min before and 5 min after irradiation with  $100 \mu\text{g}$  per injection for S1P and dhS1P, and with  $65 \mu\text{g}$  per injection for LPA.  $175 \mu\text{g}$  per 25g mouse of LPS from *Salmonella typhimurium* (Alexis) was resuspended in sterile water and injected intraperitoneally in C57BL/6 mice using a 26-gauge needle. For time  $1 \mu\text{g}$  per 25 g mouse of PTx (Sigma) into 0.2 ml Hank's balanced salt solution (HBSS), were injected intraperitoneally 2h, 30 min prior and 5 min, 2h post irradiation. After defined the MTD,  $10 \mu\text{g}$  per 25 g mouse of AKT inhibitor XI (3-Formylchromone thiosemicarbazone, Cu(II)Cl<sub>2</sub> Complex, Calbochim) into 0.1 ml of water and injected retro-orbitally in mice 30 min prior and 5 min after irradiation.

Transplantation with non irradiated bone marrow, C57Bl/6 marrow donor animals were sacrificed by hypercapnia asphyxiation and marrow cells were harvested from the medullar cavities of the femur and tibia by flushing with Hanks' balanced salt solution using a 26 gauge needle (Invitrogen). Cells were washed twice in Hanks' solution and single cell suspensions obtained by passage through a 21 gauge needle (Invitrogen). Cells were counted, diluted to  $5 \times 10^6$  cells/200  $\mu\text{l}$ , and injected into the tail vein of recipient mice 16 h after WBR.

# Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

---

## *Serum TNF $\alpha$ measurement*

Peripheral Blood from C57Bl/6 mice were harvested 1.5 h after treatment LPS and/or S1P with from the retro-orbital sinus. Serum TNF $\alpha$  levels were measured by ELISA according to the manufacturer's instructions (Biosource).

## *Leucocytes counting*

Peripheral Blood from irradiated and /or S1P-treated mice were harvested daily from the retro-orbital sinus. Peripheral blood was drawn into EDTA-coated microtubes (Melet Schloesing). Radiation-induced leucopenia was measured using hematology analyzers (Melet Schloesing).

## *Tissue preparations*

For obtaining tissue specimens, mice were sacrificed by hypercapnia asphyxiation and 2.5 cm segments of proximal jejunum, as well as the head and proximal femur, were obtained. Intestinal specimens were fixed by overnight incubation in 4% neutral buffered formaldehyde, while bone specimens were fixed in decalcifer II (Surgipath). Fixed tissues were embedded in paraffin blocks. 5  $\mu$ m thick sections of the full organ circumference were cut using an ultramicrotome and adhered to polylysine-treated slides. These sections were then deparaffinized after heating to 90°C for 10 min and to 60°C for 5 min, washed twice in xylene for 5 min each, and stained.

## *Survival of mice after WBR and evaluation of causes of animal death*

Actuarial survival was calculated by the product limit Kaplan-Meyer method and statistical significance of differences in survival were calculated by the Mantel log-rank test. Causes of death were evaluated by autopsies, performed within 60 min of animal death or when terminally sick animals displaying an agonal breathing pattern were sacrificed by hypercapnia asphyxiation. Tissue specimens were

## **Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate**

---

obtained from all organs, fixed in formaldehyde, and stained with haematoxylin as described above. GI damage was diagnosed as the cause of death when the small intestines displayed denuded mucosa with no villae and no apparent crypts. BM damage was diagnosed as the cause of death when the marrow showed complete depletion of haematopoietic elements.

### *Crypt Survival assay*

Crypt survival assay was performed as described by Withers and Elkind (19). Small intestines were harvested at 3.5 days after irradiation and hematoxylin and eosin stained as above. Surviving crypts were defined as containing 10 or more adjacent chromophilic non-Paneth cells, at least one Paneth cell, and a lumen. The circumference of a transverse cross-section of the intestines was used as a unit. The number of surviving crypts was counted in each circumference. Ten circumferences were scored in 4 mice were used to generate each data point.

### *FITC and peroxidase Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labelling*

Intestinal tissue specimens were obtained at 4 h after WBR, fixed in 4% fresh formaldehyde, embedded in paraffin, and 5  $\mu\text{m}$  sections were evaluated for endothelial apoptosis by FITC-and peroxidase-label TUNEL staining respectively according to the supplier's recommendations (Roche) and to the protocol previously described (Paris et al. 2001). Apoptosis cell count and distribution was processed as described (Paris et al. 2001).

### *CD31 and AKT immunostaining*

After overnight fixation with 4% formaldehyde, cells were permeabilized with methanol for 20 min at 4°C. Antigens were released by microwave heating with 0.1 N citrate solution. After cold PBS washes, monoclonal P-AKT (736E11, Cell Signaling Tech) and FITC- or rhodamine-coupled CD31 antibodies

## Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

---

(MEC13.3, Beckton Dickinson) diluted respectively at 1/50 and 1/200 were incubated overnight at 4°C. After PBS washes, P-AKT were detected after hybridization with rhodamine-conjugated goat anti-rabbit (BioSys), diluted at 1/200 was incubated for 1 h at room temperature. After counterstaining with 0.1 µM DAPI (Sigma–Aldrich) for 10 min at room temperature and mounting with the Fluoromount media (Southern Biotech.), slides were examined using an Axiovert 200 microscope (Carl Zeiss Inc.) with a 20x apochromat or 63x plan-apochromat objective lenses or Olympus. Axiovision software was used for both acquisition and processing of images captured using an Axiocam camera (all from Carl Zeiss Inc.). Z stack images were collected at an optical section thickness of 0.5 µm through the entire cell using the Apotome slider on the Axiovert 200.

### *Statistic analysis*

Experiments were performed at least three times. Statistical analyses were performed with StatView 6.0 package. Statistical analysis was performed with Student's t test, with 95% confidence estimations. Actuarial survival was calculated by the product limit Kaplan-Meyer method and statistical significance of differences in survival were calculated by the Mantel log-rank test.

# Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

---

## Results

### **S1P treatment rescue mice from death induced by endothelial cell apoptosis mediated by radiation or LPS treatment**

To evaluate S1P capacity to protect mice from stress-induced death, two well-established models were used: the gastrointestinal syndrome induced by exposure to high dose of radiation and the endotoxic septic shock mediated by LPS. First, S1P maximum tolerated dose (MTD) has been established. Mouse lethality was observed upon intravenous injection of 200 µg of S1P per 25 g mice (data not shown), we proposed to use two separated injections of 100 µg of S1P. S1P capacity to protect mice from irradiation-induced death was estimated by overall survey. Whole body exposure to 15 Gy killed 100% of C57Bl/6 mice exposed within 7 d with a median survival at 5 d (Figure 1A). Two S1P retro-orbital injections performed 30 min before and 5 min after irradiation delayed the animal death by 4 d ( $P < 0.01$ ). 100% of S1P-treated mice died within 11 d with a median survival at 9 days. Cause of death was evaluated by autopsies on terminally sick animals displaying an agonal breathing pattern. Mice after exposure to 15 Gy, were dying at day 5 with a large and extended GI damage characterized by a intestinal mucosa denudation complete with an absence of crypt/villae units, but displayed a inflammated, but preserved, bone marrow damage (Figure 1B). These results pointed out that mice died from radiation-induced GI syndrome, reproducing previous observation (Paris et al 2001). Dying mice pretreated with S1P before irradiation were showing aplastic anemia in femoral bones, when intestinal villae and crypts were preserved. S1P is switching the animal death from GI syndrome to bone marrow aplasia.

S1P has been shown to block radiation-induced oocytes apoptosis in vitro and in vivo (Morita, Nature Med 2001). To determine if S1P is able to inhibit cell apoptosis during GI syndrome process, duodenal tissue sections from mice 4 h after 15 Gy WBR w/o S1P were stained with hematoxylin and TUNEL

## **Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate**

---

(Figure 1C). a significant high amount of apoptotic cells (brown staining) inside the lamina propria, but a few positive cells in the epithelium monolayer in intestines from mice exposed to irradiation showed. S1P pretreatment inhibited radiation damage in the intestines by reducing the amount of apoptotic cells in the lamina propria. Endothelial cells in the lamina propria have been proposed to be one of the earliest and major targets to high dose radiation induced GI syndrome. To evaluate the endothelial cell apoptosis in the intestines after high dose radiation, double staining for TUNEL (FITC stain) and endothelial marker CD31 (rhodamine stain) has been processed (Figure 1D). Using a confocal microscope, the green fluorescence staining of the apoptotic cells is merging with the red staining of the CD31 in intestines sections from 15 Gy-irradiated mice. CD31 red staining, but not the TUNEL green fluorescence, remains visible in intestines sections from mice treated with S1P and irradiated, proving endothelial cell apoptosis inhibition by the S1P pretreatment. Functional unit of small intestines is constituted by a crypt and a villus. Amount of villae with a large number of apoptotic cells increased in function of dose (Figure 1E). As compared to only irradiated condition, pretreatment with S1P increased the amount of undamaged villae and reduced the percentage of villae containing more than 20 apoptotic cells (22% in 15 Gy-irradiated group versus 1% in 15 Gy-irradiated and S1P-treated group).

LPS-induced endotoxic septic shock and death was used to confirm the therapeutical capacity of S1P to protect mice from pathologies induced by ceramide-mediated endothelial cells apoptosis (Haimovitz-Friedman J Exp Med 1997). Injection of 175 µg of LPS per 25g mice kills 23 on 27 of the mice (85.2 %) within 4 d (median survival 42 h) (Figure 2A). After retro-orbital injection of S1P 30 min before and 5 min after 175 µg of LPS injection, only 6 on 25 mice (24 %) died. In fact, S1P rescues more than 60 % of mice treated by LPS. Injection of LPS induced TNF $\alpha$  release by activated macrophages, which induces, in cascade, massive microvascular endothelial cell apoptosis in brain, lung and intestines (Hainmovitz-friedman, J Ex Med 1997). As previously described, massive endothelial cell apoptosis estimated by



## **Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate**

---

TUNEL assay (brown staining) was observed in the intestinal lamina propria 6 h after injection of LPS (figure 2B). Pretreatment by S1P inhibited LPS-induced apoptosis. This apoptosis blockade was not correlated with a decrease of LPS-induced TNF $\alpha$  release in the serum by S1P 30 min after LPS injection (Figure 2C;  $95.17 \pm 30.9$  ng per ml in LPS group versus  $101.37 \pm 22.4$  in the LPS and S1P treated group), confirming that direct action of S1P on inhibition of LPS-mediated apoptosis.

### **Sphingolipids related to S1P are not protecting mice from radiation-induced GI syndrome**

Molecular specificity of the S1P in radiation protection was determined by use of dihydro-S1P (dhS1P), a sphingolipid structurally related to S1P, and lipophosphatidic acid (LPA), interacting with members of S1P receptor family. We already demonstrated that pretreatment with S1P is able to protect endothelial cells HMEC-1 or HAEC from radiation-induced death (Bonnaud et al 2007). Using the same experimental protocol with  $1 \mu\text{M}$  of dhS1P or LPA instead of  $1 \mu\text{M}$  S1P, no enhance of HMEC-1 endothelial protection was observed after exposure to 15 Gy (figure 3A). When pretreatment with S1P decreased endothelial apoptosis by 39.6 %, compared to 15 Gy ( $p < 0.01$ ), dhS1P decrease only by 9.28 and LPA by 1.41 % ( $p > 0.1$ ). To study their capacity to modulate GI syndrome, we first defined the MTD for dhS1P or LPA. Then sublethal dose of drugs were injected in mice with the same experimental protocols defined with S1P (e.g, 30 min before and 5 min after 15 Gy WBR). Neither dhS1P nor LPA delayed high dose of radiation-induced C57Bl/6 mice death (Figure 3B). For dhS1P treated mice, all animals died in 8 days (median 5 d ;  $p$  value), and for LPA treated mice, 100 % of mice died in 7 d (median 5 d,  $p > 0.1$ ). Cause of death evaluated by H&E demonstrated that dhS1P and LPA was not able to switch of the death from GI syndrome to bone marrow aplasia (figure 2C).

### **S1P is not modulating radioresistance of intestinal epithelial cells**

## **Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate**

---

Crypt survival assay was used to better define S1P survival properties in radiation-induced GI syndrome. Number of crypts per duodenum's circumferences was counted in mice pretreated by S1P or its vehicle and expose to a dose range of ionizing radiation and sacrificed 3.5 days later. Number of crypts per intestines section decreased with dose (figure 4A). After 15 Gy, less than 1 crypt per circumference was quantifiable ( $0.58 \pm 0.3$ ). S1P pretreatment enhanced crypt survival. Number of crypts for the 15 Gy + S1P group was higher ( $3.48 \pm 1.4$ ), reaching a isoeffect closed to 13 Gy + vehicle group. The fact that S1P protect endothelial cells in cell culture model, but also in small intestines, does not exclude a protection of other cell types, such as epithelial cell. For example, S1P has been shown to protect primary rat intestinal epithelial cells, IEC-6 after TNF $\alpha$  incubation (greenspoon, Dig Dis Sci 2008). Using the same primary epithelial cell model, we showed that IEC-6 cells are not protected by S1P after exposure to high dose radiation. Neither clonogenic survival nor early radioprotection are enhanced by pretreatment of IEC-6 by 1 $\mu$ M S1P. DL<sub>50</sub> from the clonogenic assay is respectively vehicle or S1P treated IC-6, 3.2 and 4.2 Gy (Figure 4B). Studies on early death after exposure to 15 Gy demonstrated that S1P is not able to inhibit IEC-6 apoptosis induced by high dose radiation (figure 4C;  $p > 0.1$  at 24h and at 48). Clonogenic assay and death study of transformed mouse crypt intestinal cell line T84 have been also processed and could not find any difference of radiosensitivity despite treatment w/o S1P (data not shown).

### **Cothérapie S1P and bone marrow transplantation is necessary to long term rescue of irradiated mice**

Hematopoietic cells are also known to be sensitive to radiation and to respond to S1P. One of the physiological function of S1P is to exit lymphocytes from lymphoid organs (Rosen, Nat Rev Imm 2005). S1P capacity to protect B and T lymphocytes from radiation-induced death has been processed using human peripheral blood mononuclear cells extracted from fresh human blood. After S1P and irradiation treatments, T lymphocytes were detected by FACS with pacific blue-anti-CD3, apoptosis

## **Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate**

---

with FITC-Annexin V and the whole cell population with 7-AAD (figure 5A). Quantification using FACSDiva 6.1 software of the dead T lymphocytes did not permit to discriminate a protective effect of S1P in PBMC treated with 15 Gy versus PBMC only irradiated at 15 Gy (figure 5B). Increase of radiation-induced death in T lymphocytes were increasing in a time dependent manner to reach at 72 h  $50.5 \pm 13.4$  for 15 Gy irradiated group and  $47.3 \pm 7.3$  for 15 Gy + S1P group ( $p > 0.1$ ). B lymphocytes death was also estimated by FACS using APC-CD19, FITC-Annexin V and 7-AAD (figure 5C). B lymphocytes were more sensitive to radiation than T lymphocytes. However, quantification of the dead B lymphocytes did not permit to discriminate a radioprotective effect in PBMC treated with 15 Gy and S1P versus PBMC only irradiated at 15 Gy (figure 5B). Increase of radiation-induced lethality in B lymphocytes were reaching a plateau at 24h  $57 \pm 10$  for 15 Gy irradiated group and  $58.3 \pm 10.5$  for 15 Gy + S1P group ( $p > 0.1$ ).

Mice treated with S1P injection died from bone marrow aplasia with a severe leucopenia. To confirm that S1P does not seem to protect haematopoietic cells from radio-induced toxicity, leucocytes were counted in C57Bl/6 mice 4 hours then every day post-irradiation for 4 days. Without radiation, leukocyte numbers slightly increased at days 2, 3 and 4 post-injection of vehicle or S1P without statistical difference (day 4:  $29.4 \pm 5.9$  % in control condition versus  $24.4 \pm 10.7$  % in S1P condition ( $p > 0.1$ ); Figure 5E). This increase can be due to an inflammatory response to vehicle or S1P injections. After 15 Gy WBR, leukocyte count decreased in a time dependent manner, with no respect with the injection or not of S1P (day 4:  $0.21 \pm 0.08$  % in control condition versus  $0.17 \pm 0.14$  % in S1P condition ( $p > 0.1$ ); Figure 5E).

Hematologic cells are not protected by S1P from high dose radiation. Agonal mice treated with 15 Gy and S1P presented severe bone marrow aplasia, which may explain the death. We validated these results by performing autologous bone marrow transplantation 16 hours after 15 Gy-WBR irradiation. 100% of the 15 Gy mice and 15 Gy + bone marrow mice died respectively within 7 or 8 days (median

## **Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate**

---

survival is resumed in figure 6B), proving that 15 Gy WBR mice do not die by bone marrow aplasia (Fig. 6A). Cotreatment with S1P and bone marrow increased survival of irradiated mice. Whereas mice treated only with S1P are dying within 11 days, 60% mice treated with S1P and bone marrow transplantation stayed alive 100 days post-irradiation. Surviving mice were awake as the unirradiated ones and did not display any gross dysfunction, except fur coat depigmentation due to irradiation (Fig. 6C). Death appears suddenly without any agonal symptoms about 4 months post-irradiation. Circumstance of the death was not investigated.

### **S1P-induced survey acts through the extracellular pathway**

Cell functions induced by exogenous S1P may be mediated by either intracellular or extracellular mechanisms. Extracellular signalling involves binding of S1P to its receptors. Receptors utilize heterodimeric GTP-binding regulatory proteins to initiate intracellular signalling. Pertussis toxin (PTx) catalyses the ADP-ribosylation of  $\alpha$  subunits of G proteins, resulting in an uncoupling from receptors. To precisely involve the extracellular pathway in S1P-induced endothelial radioprotection, HMEC-1 cells have been treated with 100 ng/PTx per ml of cell medium before 1  $\mu$ M S1P treatment and 15 Gy irradiation. Treatment with S1P inhibited irradiation-induced endothelial death defined by dead floating cell count (32.7 $\pm$ 6.3% 15 Gy vs 13.6 $\pm$ 2.6% 15 Gy + S1P;  $p=0.01$ ; Figure 7A). PTx pretreatment inhibited the radioprotection mediated by S1P (23.4 $\pm$ 4.4%,  $p>0.1$ ; vs 15 Gy +S1P), when PTx did not increase HMEC-1 sensitivity exposed to 15 Gy (28.6 $\pm$ 5.4%,  $p>0.1$ ; vs 15 Gy). Inhibition by PTx of S1P-induced endothelial cell survey has been confirmed in 15 Gy-irradiated cells by facs analysis after TUNEL staining (Figure 7B), but also by DVEDase activity measuring caspases 3 and 7 activities (Figure 7C). Then, S1P radioprotection-mediated by the exogenous pathway has been challenged *in vivo* using the GI syndrome model (Figure 7D). As previously explained, whole body exposure to 15 Gy killed 100% of C57Bl/6 mice exposed within 7 days. Intra-peritoneal injection of 1  $\mu$ g of PTx 2 hours and 30

## **Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate**

---

min before and 5 min and 2 hours after radiation did not modify mice survival as compared to sham control where mice were only irradiated at 15 Gy. However, PTx pretreatment increase mice sensitivity to 15 Gy WBR and S1P (median survival S1P = ; PTX + S1P = ;  $p =$ ). Agonal irradiated mice cotreated with PTx and S1P showed severely damage small intestines lacking crypt and villus. Death's cause of irradiated mice was switch from bone marrow aplasia in S1P-treated cohort to GI syndrome in the PTx- and S1P-treated group (Figure 7E). Capacity of PTx to inhibit GI syndrome was explained by its ability to reintroduce endothelial apoptosis inhibited by S1P pretreatment inside the lamina propria 4 hours after WBR at 15 Gy. Green florescence of positive apoptotic endothelial cells for TUNEL observed in the lamina propia after 15 Gy and inhibited by S1P was reactivated by pretreatment with PTx (Figure 7F).

### **S1P-induced AKT activation is mediated by the extracellular pathway**

AKT through its phosphorylation represents a robust survival factors inhibiting endothelial cell apoptosis. Western blot from S1P-treated HMEC-1 cells induced phosphorylation of AKT within 15 min (Figure 8A). PTx pretreatment inhibited AKT phosphorylation. Results have been confirmed *in vivo*. Only S1P, but not S1P + PTx, pretreatment in mice induced AKT phosphorylation within 15 min, specifically inside the lamina propria (Figure 8B). To define the cell type overexpressing phospho-AKT, FITC- $\alpha$ CD31 and rhodamine- $\alpha$ phospho-AKT have been concomitantly hybridized on intestines slides from S1P-treated mouse (figure 8C). Green FITC staining colocalized with the red rhodamine staining as shown as the yellow merging staining, proving that S1P induced AKT activation, specifically into the endothelial cells. To demonstrate the key role of AKT activation in survival pathway inhibiting radiation-induced endothelial cell apoptosis, HMEC-1 cells have been pretreated with 1  $\mu$ M AKT inhibitor, LY290004 prior to 1  $\mu$ M S1P and exposure to 15 Gy. As previously described S1P inhibited radiation-induced endothelial cell apoptosis observed by Igarashi et al (JBC 2001). S1P treatment inhibited irradiation-induced endothelial death defined by dead floating cells ( $23.1 \pm 3.4\%$  15 Gy vs

## Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

14.5±1.1% 15 Gy + S1P;  $p < 0.01$ ; Figure 9A). LY290004 pretreatment inhibited the radioprotection mediated S1P (23.8±6.5%,  $p > 0.1$ ; vs 15 Gy +S1P), when LY290004 slightly modulate the HMEC-1 sensitivity after 15 Gy (27±6%,  $p > 0.1$ ; vs 15 Gy). Inhibition by PTx of S1P-induced endothelial cell radioprotection has been confirmed by Apo 2.7 facs analysis (Figure 9B). Then, AKT inhibitor modulating S1P-induced radioprotection has been tested *in vivo* on the GI syndrome model. Because of LY290004 is diluted in DMSO, a reactive oxygen species scavenger, AKT inhibitor XI (AKTi) from Merck, diluted in water was preferred for the *in vivo* experiments. First, AKTi MTD has been established and a pharmacological protocol of 10 µg per 25 g mouse injected by retro-orbital pathway 30 min before and 5 min after irradiation. Then, inhibition of AKT phosphorylation in small intestines treated with S1P has been verified by immunostaining (Figure 9C). Red staining of rhodamine-phospho-AKT detectable in the endothelial cells of S1P-treated mice villae, was disappearing when S1P-treated mice was concomitantly treated with S1P and AKTi, proving the pharmacological action of the AKT inhibitor. AKTi injection before sensitivity of mice exposed to 15 Gy (Figure 9D). However, AKTi pretraetment inhibited S1P-induced protection and shortened the survival of irradiated mice (median survival S1P = 8; AKTi+ S1P = 6 ;  $p =$ ). Agonal irradiated mice cotreated with AKTi and S1P showed severely damage small intestines lacking crypt and villus. Death's cause of irradiated mice was switch from bone marrow aplasia in S1P-treated cohort to GI syndrome in the AKTi- and S1P-treated group (Figure 9E).

# Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

---

## Discussion

Vascular endothelium is considered as key tissue to maintain physiological organ homeostasis. Recent researches have shed new light on the critical role of tissue microvasculature in regulating the tissue response to stresses. Endothelial cell apoptosis is driven by an activation/relocalisation of acid sphingomyelinase inducing ceramide generation and death. Recent *in vitro* works already showed that S1P, a ceramide antagonist, can preserve quiescent endothelial cells in culture from radiation-induced apoptosis. In this present study, we define S1P as a new relevant pharmacological drug acting against endothelial apoptosis and acute organ necrosis using two different physiopathological mouse models, eg LPS-induced septic shock and radiation induced gastrointestinal-syndrome.

Endotoxemia contributes to endothelial dysfunctions by inducing loss of vascular permeability, vasomotion, leucocyte recruitment and adhesion, endothelial activation and apoptosis. (Dauphinee Lab Invest. 2006). Treatment with 1 $\mu$ M S1P or 0.1 mg/kg FTY720 inhibited pulmonary/renal vascular leakage induced by injection of a moderate dose (50  $\mu$ g per mouse) of LPS (Peng American Journal of respiratory and critical care medicine 2004). Higher dose of LPS (175 $\mu$ g per 25g mouse) in mice resulted rapidly in a disseminated form of endothelial cell apoptosis, mediated by TNF- $\alpha$  secretion by activated immune cells, preceding organ failure and death (Haimovitz-Friedman, J. Ex. Med, 1997). In this present study, we are able to protect mice from high dose of LPS and death by retro-orbital injection of S1P. Moreover, using intestines sections as readout for the endothelium collapse, we show the injection of S1P prevents LPS-induced TUNEL positive apoptotic cells. A potential indirect pro-survival role of S1P by inhibiting pro-apoptotic cytokines secreted by immune cells is excluded because of the lack of modulation of TNF $\alpha$  secretion in the serum from mice treated either by LPS or by LPS and S1P.

Exposure to high dose of radiation also induced in mice acute endothelial cell apoptosis, leading to major damage in central nervous system and small intestines (Pena et al., Cancer Res. 2000; Paris et

## **Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate**

---

al., Science 2001, Gutkov, Science 2008, Sung BBRC 2006). We demonstrate in this present study that retro-orbital injection of S1P prevents radiation-induced endothelial apoptosis, protects intestinal tract and prolongs mouse survival. Involvement of endothelial cells in radiation-induced acute pathogenesis still remains challenge in the past years. Schuller and coll. were not able to observe endothelial cells in apoptosis in small intestines from 12 Gy-irradiated mice (schuller et al, 2007). One of the major concerns was the method and the difficulty of detecting apoptosis in small intestines section exposed to ionizing radiation. In this present study, we were able to strongly confirm endothelial cells apoptosis in the lamina propria 4 h after exposure to 15 Gy WBR by TUNEL assay, revealed either by peroxidase- or FITC-coupled antibodies. Because of the streptavidin-biotin complex amplification, manifestation of the endothelial apoptosis signal was visually more massive using the peroxidise labelling as compared to the fluorescence staining. We already proved that S1P is able to protect primary or transformed endothelial cells from radiation (bonnaud Cancer res 2007). Despite a protection of crypt survival by S1P over the dose range of radiation, radiosensitivity of primary IEC-6 intestinal epithelial cells (fig 4), as seen by clonogenic and apoptosis tests, are not mitigated by S1P pretreatment. Result was confirmed using other transformed intestinal T84, and colic Caco2 and HCT116 epithelial cell lines (data not shown), Discrepancy of S1P radioprotection between endothelium and epithelium may be understood by difference in cell death mechanisms. Endothelial cells are dying through a rapid ceramide dependent apoptosis, when epithelial cells are more subject to delayed mitotic death (Merrit, Oncogene 1997). S1P protects IEC-6 cells from apoptosis induced by treatment with TNF $\alpha$  and cycloheximide (greenspoon Dig Dis Sci, 2009). Again, S1P may protect epithelial cell death from apoptotic mechanism triggered by TNF $\alpha$ , but not from mitotic catastrophe induced by radiation-induced DNA damage.

LPA and dhS1P represent two phospholipids structurally related to S1P. However, none is protecting endothelial cells or increasing overall mice survival after irradiation at 15 Gy (fig 3). LPA has been



## **Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate**

---

demonstrated to protect primary IEC-6 cells from radiation induced-death (Deng Gastroenterology, 2002). Crypt epithelial stem cell apoptosis is characterized by two distinct temporal waves, respectively around 4 and 24h after exposure to radiation. LPA, but not S1P, is protecting crypt epithelial cells from early apoptosis in 15 Gy-irradiated mice (ref and personal data), which is p53 dependent and ASM independent, proving different protective functions of the two sphingolipids. This discrepancy may be used by combined injection of both sphingolipids to obtain a stronger radioprotective effect against the GI syndrome.

Hematocrit blood count and histological studies on agonal mice respectively demonstrate a lack of protection of S1P against radiation-induced leucopenia and bone marrow aplasia (fig 5). Mice injected with S1P and irradiated at 15 Gy are protected by transplantation of fresh non-irradiated bone marrow 16 h after irradiation (fig 6), dying suddenly 4 months after irradiation. Bone marrow aplasia induces death through the depletion of the pool of hematopoietic cells. In the immune system, transient effects of extracellular S1P on T- and B-lymphocyte enhance trafficking in the lymphoid system, lymphocyte migration in non-immune tissues and cytokine generation. S1P and its receptors are required for the emigration of thymocytes from the thymus, the trafficking of lymphocytes in secondary lymphoid organs and the migration of B cells into splenic follicles (Rosen, Nat Rev Imm 2005). T lymphocytes and B lymphocytes harvested from human peripheral blood were sensitive to radiation in a time dependent manner, as seen by annexin V and CD3 or CD19 coimmunostaining. However, pretreatment with S1P of mice before irradiation do not modulated lymphocyte radiosensitivity (fig 5). Coderre and col. were arguing that apoptotic cells observed in the lamina propria after 12 Gy radiation were in fact not endothelial cell pool but lymphoid cells as seen by the CD45 colocalization with apoptotic TUNEL staining. If we agree with the high radiosensitivity of lymphocytes, we exclude lymphoid cells as part of the cell pool protected in mice treated by S1P mice.

## Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

---

Over the year, S1P has been considered as a key bioactive sphingolipid involved in a large number of biological functions. Two independent S1P signalling pathways, through either extracellular through the binding to GPCR receptors or intracellular through the accumulation in the cytoplasm by activation of sphingosine kinase or inactivation of sphingosine lyase, have been clearly defined. If inhibition of apoptosis by S1P has been considered from the early studies (Cuvillier Nature 1997), mechanisms remain unknown. Either intra- or extracellular pathways are considered to be involved in endothelial cell survival signal in culture model. For example, serum starvation-induced HUVEC endothelial cell death is mitigated by inhibiting either the extra cellular pathway under PTx treatment (Kimura JBC201) or the intracellular pathway by overexpression sphingosine kinase 1 (Iimaye blood 2005). Link between the two pathways may be the exportation of intracellular S1P by the ABC transporter, which will activate S1P receptors by an autocrine or paracrine activities (Kim, BBA, 2009). pS1Pless conditional mice lacking sphingosine kinases with undetectable level of plasma S1P are protected from platelet activating factor- or histamine-induced anaphylaxis (Camerer JCI, 2009). Plasma S1P helps to maintain vascular integrity and regulate anaphylaxis-induced vascular leak by inhibiting endothelial permeability through signalling by S1P1 receptors. Adding fresh exogenous S1P increases endothelial survival after LPS or radiation stress, disclaiming a saturation of the survival S1P signal by its plasmatic pool.

Characterization of endothelial apoptosis by S1P has been explored into *in vitro* models. However, we have already injected S1P locally into intra-bursa injection to protect oocytes from radiation- and doxorubicin- induced death (Morita Nat medicine 2001). Oocytes survival was not mitigated by PTx, proving a S1P dependent intracellular protective pathway. Extracellular protection by S1P has not been directly investigated *in vivo*, but indirectly through the use of related agonist/antagonist of S1P to its receptors. The most studied drug is the FTY720, a synthetic myriocin analogue, binding to S1P1 and S1P3 receptors. FTY720 has been considered as a functional antagonist by internalising and degraded by the proteasome S1P1 receptors (ref Hla), preventing S1P-mediated biological functions, such as

## Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

---

tumor angiogenesis or migration and Ca<sup>2+</sup> mobilization in HUVEC (Iamontagne, Cancer Res, 2006).

Endothelial apoptosis modulation have not been tested after treatment with FTY720. However, invalidating with an antisense strategy the S1P1 or S1P3 receptors is reversing S1P protection of serum deprivation-induced HUVEC death (Kwon, JBC 2001). Furthermore, use of PTx, decoupling the S1P receptor from G(i) protein resume the molecular mechanism by inhibiting S1P-induced NO production and endothelial survival. Our data support the involvement of the extracellular pathway in the S1P-induced endothelial cell protection after exposure to irradiation (fig 7). S1P protection of endothelial cell apoptosis detected by TUNEL in cultured HMEC model or directly in the lamina propria was reverted by PTx pretreatment. Further investigations using S1P receptor transgenic models or specific inhibitors will permit to better define the receptor(s) involved in survival signal.

PI3K/AKT is considered as a robust survival pathway involved in endothelial cell integrity. When proapoptotic ceramide inhibited AKT phosphorylation, S1P is considered as one of the strongest activator. Use of AKT phosphorylation as readout was interesting for different reasons: confirming the mechanism of action of S1P and the involvement of endothelial cells in the pathogenesis of the syndrome gastrointestinal. In fact, pretreatment of mouse with S1P induced specifically AKT phosphorylation in the lamina propria, but not in the epithelial cells. Furthermore, *in vitro* and *in vivo* studies demonstrated that AKT phosphorylation is under the control of the exogenous S1P pathway, as shown by the inhibition of S1P-induced phospho-AKT by PTx pretreatment (fig 8). Finally, coimmunostaining between phospho-AKT antibodies and CD31 showed the specific activation of survival factor AKT by S1P in the endothelial cells compartment of the lamina propria. The fact that pharmacological inactivation of phospho-AKT blocked S1P-induced protection of small intestines after irradiation (fig 9), represent our last, but solid proof, of the crucial role of endothelial compartment to regulate small intestines fate after exposure to ionizing radiation. So, we defined AKT as a new actor involved in the protection against radiation-induced GI syndrome. Different pharmacological strategies

## Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

---

have already been developed with success to inhibit AKT activation or expression enhancing tumor endothelial cells and tumor radiosensitivity (Diaz B J cancer 2009; Edwards E Cancer Res 2002). No description of the radiotoxicity of these targeted therapies in small intestines or other tissues has been showed. In our study, inhibiting AKT activation does not modulate mouse survival after irradiation. However, the fact that activated AKT basal level observed by phosphoimmunostaining is undetectable in small intestines sections from mice not treated by S1P is consistent with the similarity of survey of the 15 Gy-irradiated mice treated w/o AKT inhibitor.

In conclusion, we proved that exogenous S1P represents a relevant therapeutic agent able to inhibit *in vivo* endothelial apoptosis-mediated pathologies, e.g GI syndrome and LPS-induced septic shock, through the promotion of endothelial cell survival. In this present article, we demonstrated that inhibition of proapoptotic ceramide-dependent pathway by its metabolite S1P is a relevant therapeutic agent able to inhibit *in vivo* endothelial apoptosis-mediated pathologies, e.g GI syndrome and LPS-induced septic shock, through the promotion of endothelial cell survival. However, further investigations will be necessary to deeper understand survival molecular mechanisms induced by S1P. Intracellular amount of S1P in the cells or in the plasma must be correlated to the capacity to the endothelial protection. Lack of plasma S1P sensitizes pS1Pless mice to anaphylaxis. Injection of S1P1 agonist reverses the phenotype in pS1Pless mice, but not in wild type mice, proving S1P present in the plasma was sufficient to control the anaphylaxis response. Because add of exogenous S1P is able to protected endothelium from LPS or radiation exposure, plasma S1P by itself must be inefficient to control endothelial cell fate. Injection of exogenous S1P must be considered as new class of pharmacological drugs preventing endothelial collapse-mediated pathology. However, S1P is known for its plethoric biological functions, such as proliferation, adhesion, inhibition of permeability, lymphocyte maturation. Further works on the pharmacological modulation of sphingosine kinase or sphingosine lyase expression, which change the intracellular S1P, or on the characterization of the S1P

## **Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate**

---

receptor(s) involved in the survival signal transduction should be necessary to better define a class of drugs activating endothelial protection with minimal side effects.

# Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

Fig. 1

Bonnaud et al.

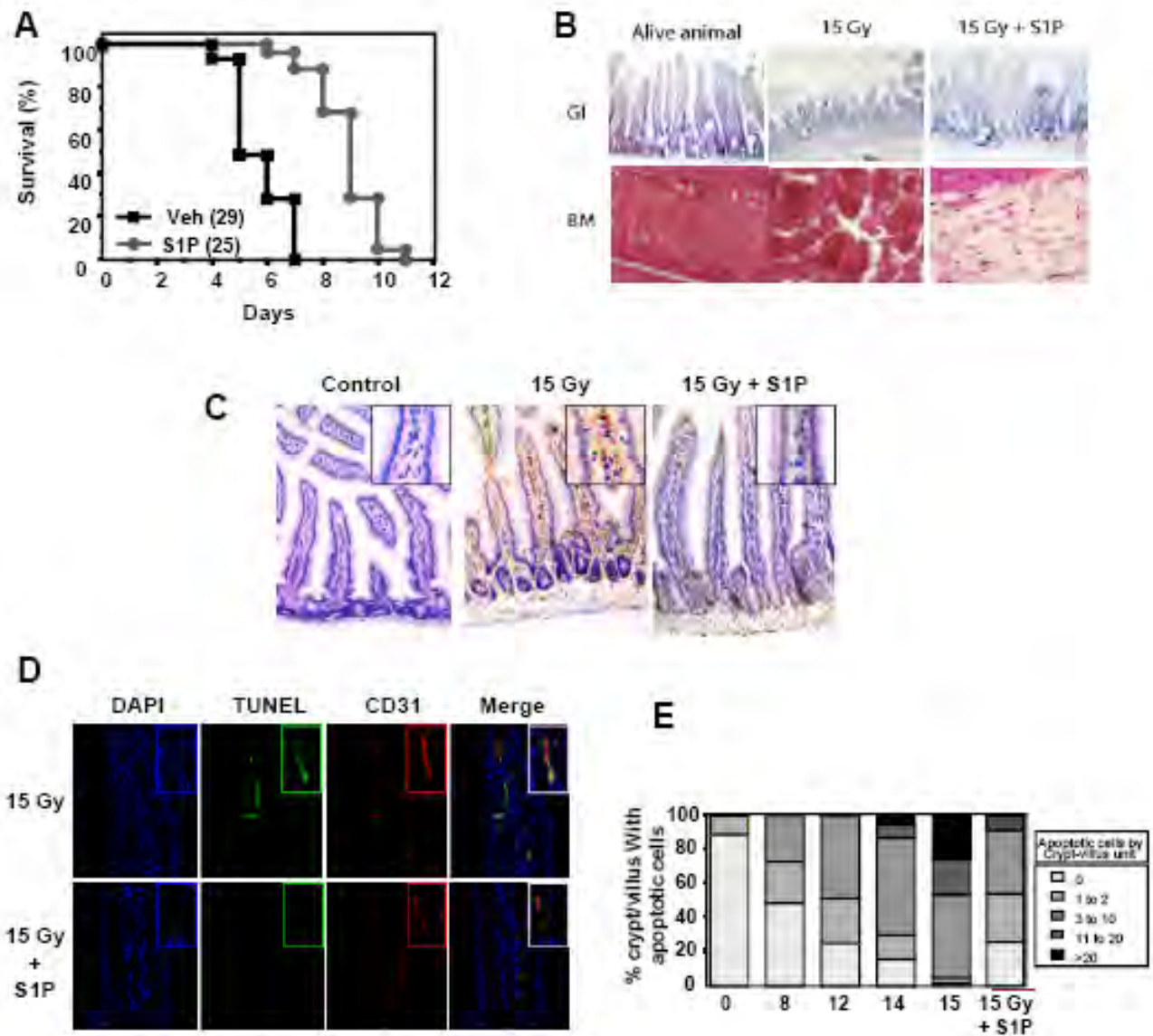


Figure 1

S1P treatment rescues mice from death induced by endothelial cell apoptosis mediated by high dose of radiation (A) Survival curves of C57Bl/6 mice receiving injection of vehicle (■) or S1P (●) (100 µg/injection) 30 min before and 5 min after 15 Gy WBR. Number in parentheses indicates animals per group. (B) H&E-stained sections of duodenum and femur obtained from agonal breathing animals treated by 15 Gy WBR w/o S1P. (C) Apoptosis in duodenum harvested 4 h after 15 Gy WBR w/o S1P. Apoptosis was evaluated by peroxidase-TUNEL staining (brown) counterstained with hematoxylin (blue). D: Co-hybridization between FITC-stained TUNEL and rhodamine-coupled αCD31. Co-localisation between the apoptotic (green) and the endothelial (red) markers is shown by the yellow staining of the merge picture. DAPI (blue) is used as a counterstain. Magnification was 200 x. E: Apoptotic cell distribution by crypt/villus unit. Groups 0, 1-2, 3 to 10, 10 to 20 and up to 20 have been made to clarify the histogram.

# Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

Fig. 2

Bonnaud et al.

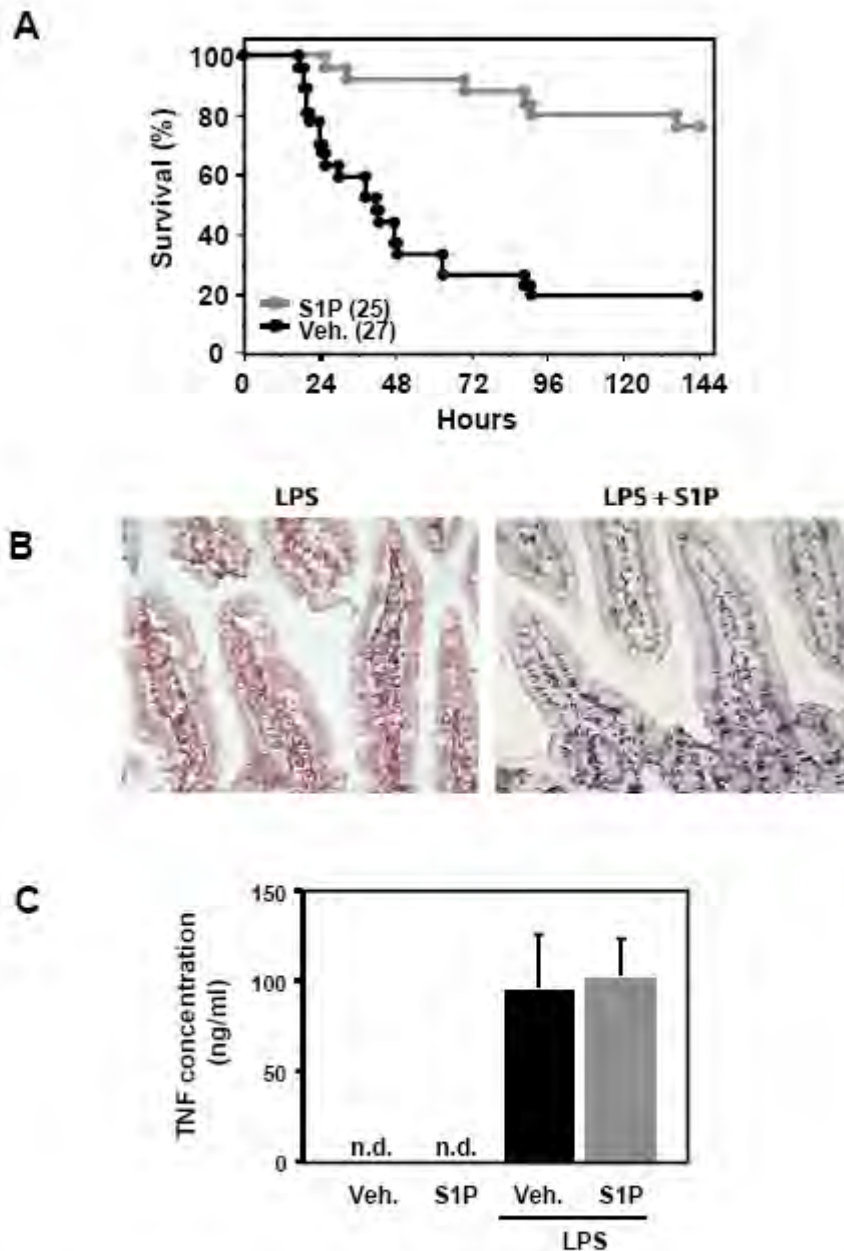


Figure 2

**S1P treatment rescues mice from death induced by endothelial cell apoptosis mediated by LPS treatment** (A) Survival curves of C57Bl/6 mice after LPS injection (175  $\mu$ g per 25g mouse). Mice were treated either with vehicle (●) or with S1P (●) (100  $\mu$ g/injection) 30 min before and 5 min after LPS. Number in parentheses indicates animals per group. (B) Apoptosis in duodenum harvested in mice 6 h after LPS w/o S1P treatment. Sections were evaluated for apoptosis by using peroxidase-TUNEL staining (brown) counterstained with hematoxylin (blue). (C) Serum TNF $\alpha$  levels from LPS and/or S1P-treated mice were measured by ELISA (Mean  $\pm$  SD; n=3 mice per condition)

# Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

Fig. 3

Bonnaud et al

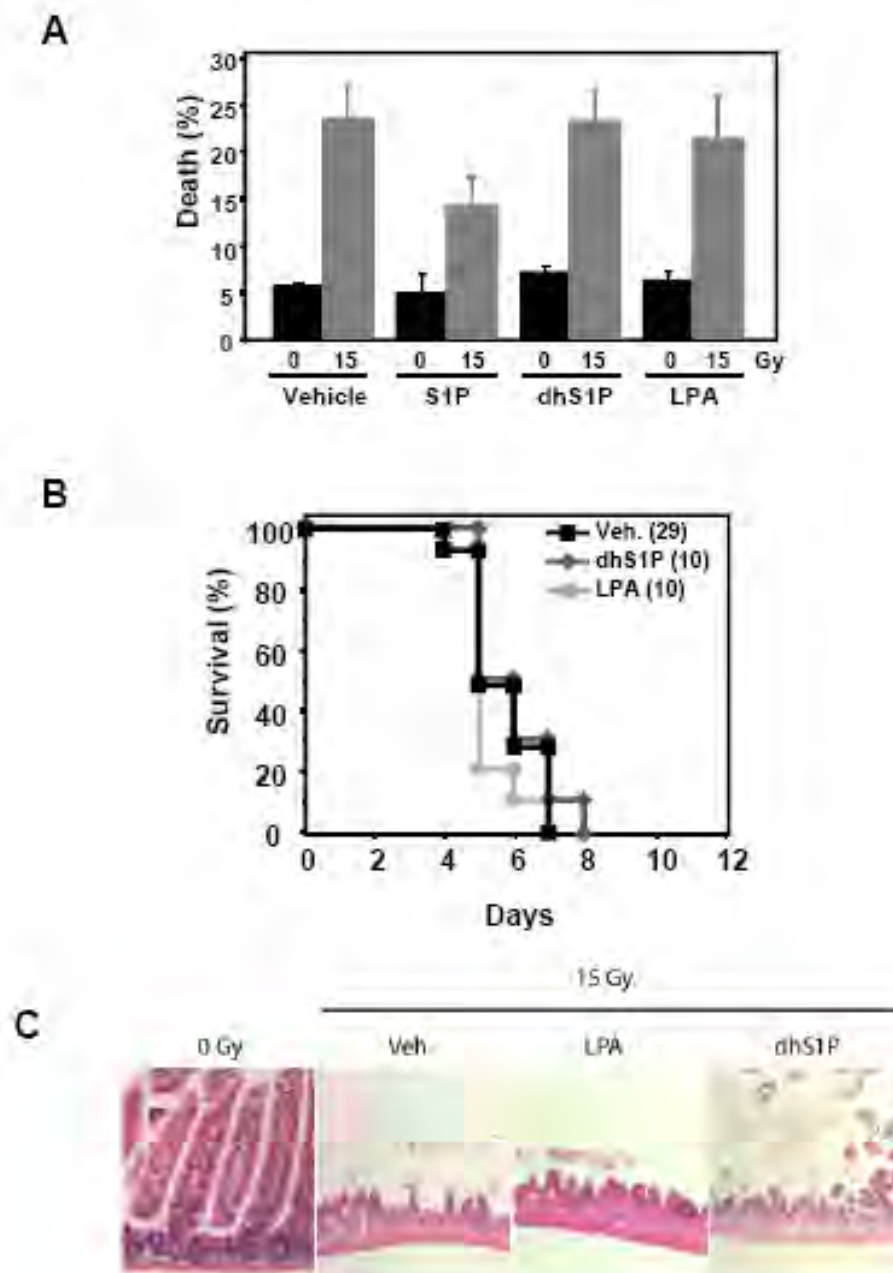


Figure 3

S1P-related lipids, LPA and dhS1P, does not protect mice from radiation-induced GI syndrome (A) Apoptosis of HMEC-1 treated 2 h with 1  $\mu$ M S1P, dhS1P or LPA prior to 15 Gy. Death evaluation was made 24 h later by cell counting assay (Mean $\pm$ SD; n = 3 independent experiments). (B) Survival curves of C57Bl/6 mice receiving vehicle (■), dhS1P (♦) (100  $\mu$ g/injection) or LPA (◊) (83  $\mu$ g/injection) 30 min before and 5 min after 15 Gy WBR. Number in parentheses indicates animals per group. (C) H&E-stained sections of duodenum and femur obtained from agonal breathing animals treated by 15 Gy WBR w/o dhS1P or LPA.



# Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

Fig. 4

Bonnaud et al.

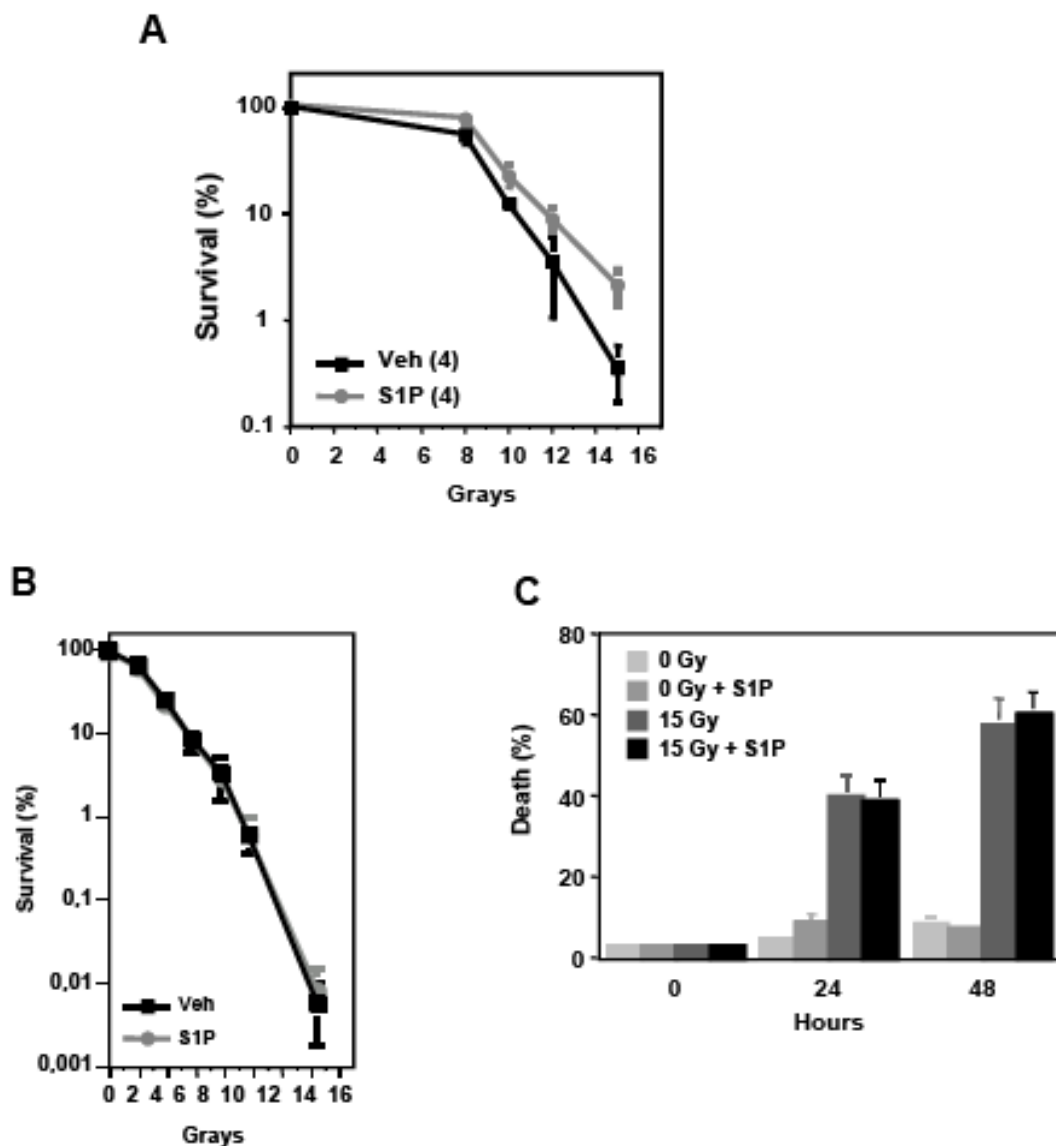


Figure 4

**S1P does not protect intestinal epithelial cell from radiation exposure** (A) Crypt survival assay on transverse cross-section slides from duodenum harvested 3.5 days after WBR between 2 and 15 Gy treated or not with 1  $\mu$ M S1P. After H&E staining, number of surviving crypts was counted in each circumference. Ten circumferences were scored in 4 mice were used to generate each data point (Mean $\pm$ SD, n=4). (B) Clonogenic assay of IEC-8 intestinal epithelial primary cells treated with vehicle ( $\blacksquare$ ) or 1 $\mu$ M S1P ( $\bullet$ ) 2 h before irradiation between 2 and 15 Gy. Clonogenic fraction was normalized to the unirradiated clonogenic fraction (Mean $\pm$ SEM; n=3 independent experiments performed in duplicate). (C) IEC-8 death ratio estimated after incubation for 2 h with treated with vehicle ( $\blacksquare$ ) or 1 $\mu$ M S1P ( $\bullet$ ), then irradiated at 15 Gy. Adherent and apoptotic floating cell were counted at 0, 24, 48 h post-irradiation (Mean $\pm$ SD; 3 independent experiments performed in triplicate).

# Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

Fig. 5

Bonnaud et al

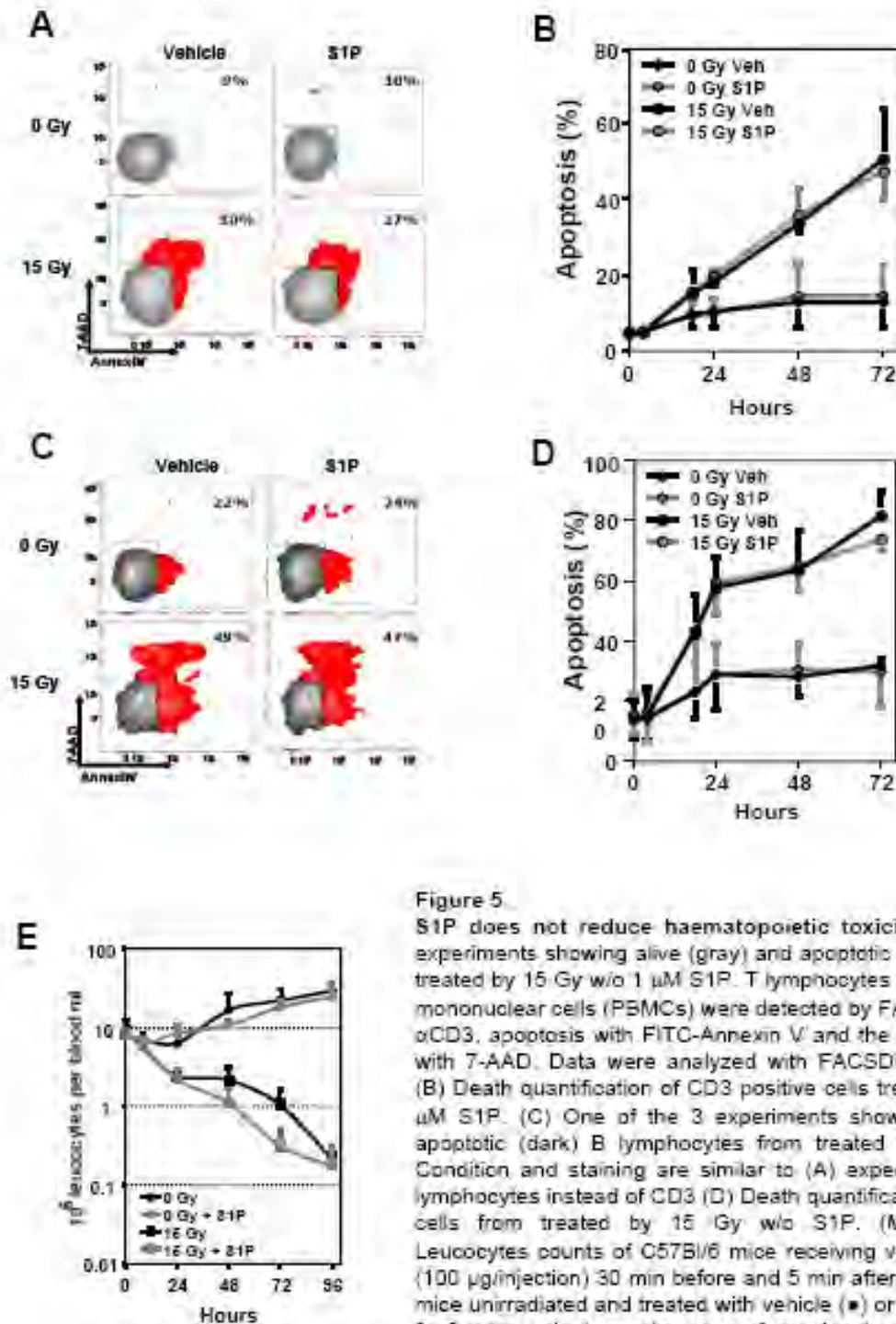


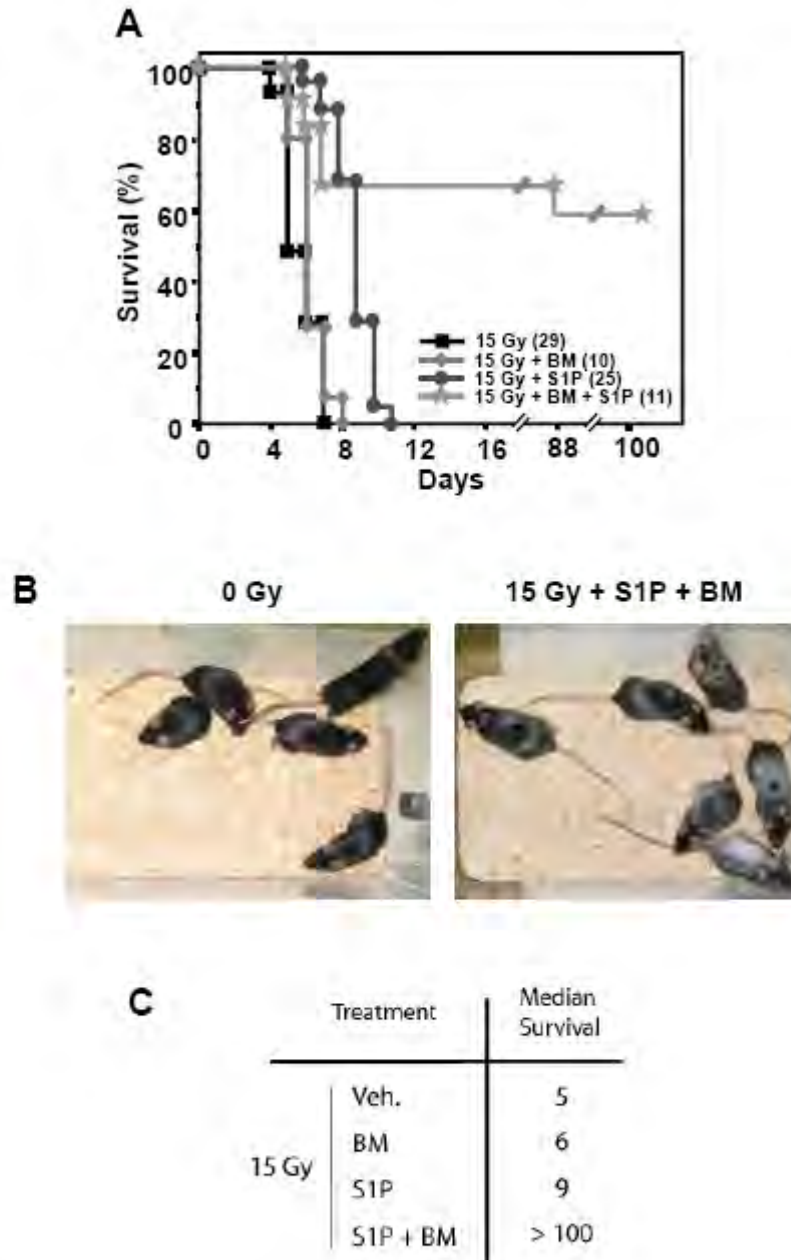
Figure 5

S1P does not reduce haematopoietic toxicity (A) One of the 3 experiments showing alive (gray) and apoptotic (dark) T lymphocytes treated by 15 Gy w/o 1  $\mu$ M S1P. T lymphocytes from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were detected by FACS with Pacific Blue- $\alpha$ CD3, apoptosis with FITC-Annexin V and the whole cell population with 7-AAD. Data were analyzed with FACSDiva (Mean $\pm$ SD, n=3). (B) Death quantification of CD3 positive cells treated by 15 Gy w/o 1  $\mu$ M S1P. (C) One of the 3 experiments showing alive (gray) and apoptotic (dark) B lymphocytes from treated by 15 Gy w/o S1P. Condition and staining are similar to (A) expect APC- $\alpha$ CD19 for B lymphocytes instead of CD3 (D) Death quantification of CD19 positive cells from treated by 15 Gy w/o S1P. (Mean $\pm$ SD, n=3). (E) Leucocytes counts of C57Bl/6 mice receiving vehicle (■) or S1P (□) (100  $\mu$ g/injection) 30 min before and 5 min after 15 Gy WBR. Control mice unirradiated and treated with vehicle (●) or S1P (○) (Mean $\pm$ SEM for 3 independent experiments performed in duplicate).

# Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

Fig. 6

Bonnaud et al.



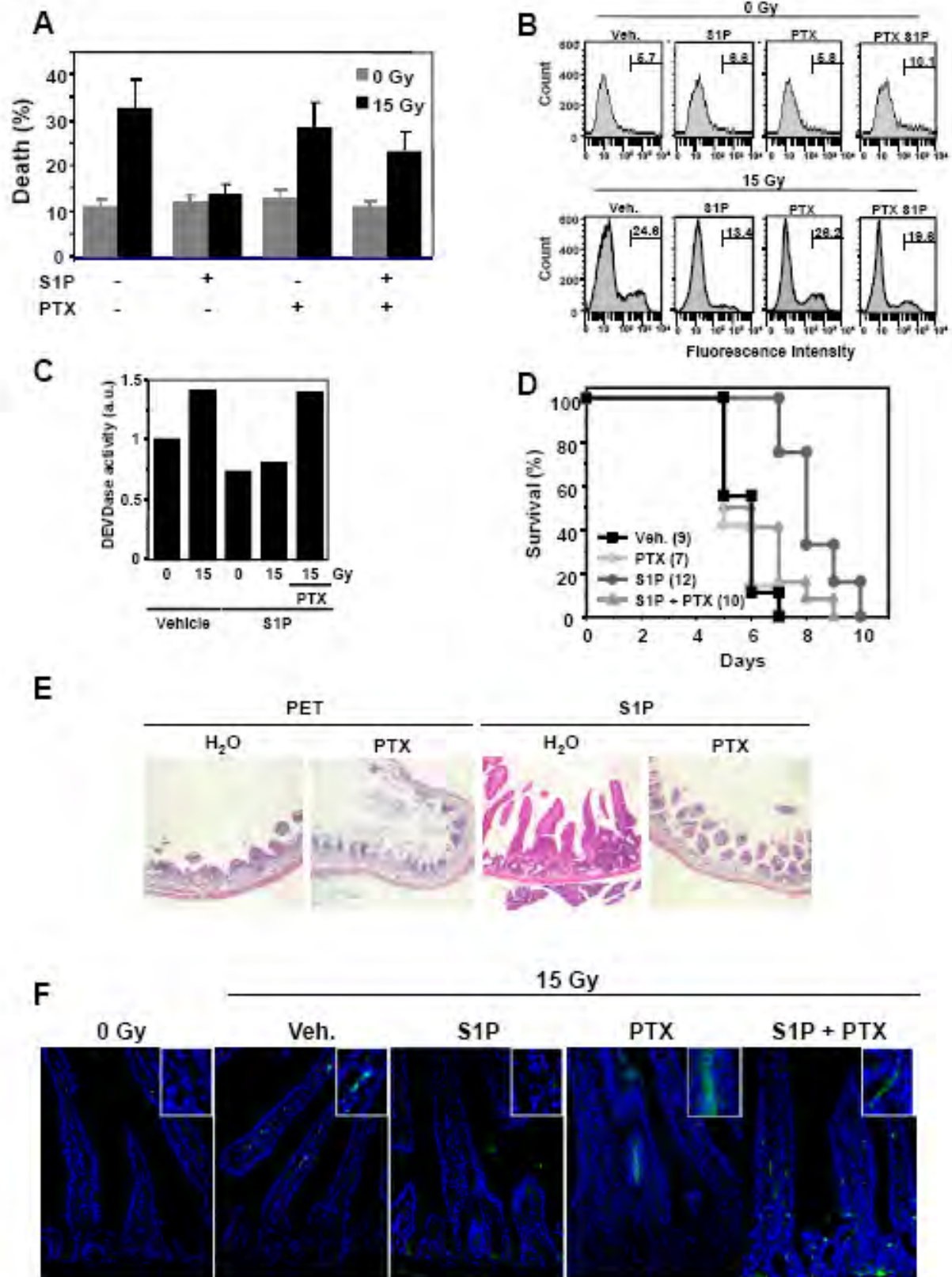
**Figure 6**

**Long term rescue of 15 Gy-irradiated mice by S1P treatment and bone marrow transplantation** (A) Survival curves of C57Bl/6 mice after 15 Gy WBR. Mice received injection of vehicle (■), or S1P (●) (100 µg/injection) 30 min before and 5 min after irradiation, or 5x10<sup>6</sup> bone marrow (BM) cells from non-irradiated mice donor 16 h before irradiation (\*), or both treatments S1P and BM (◐). Number in parentheses indicates animals per group. (B): Pictures of unirradiated mice versus S1P- and BM-treated mice 50 days post 15 Gy radiation. (C) Median day survival of 15 Gy-irradiated mice treated either by the vehicle, or the BM, or the S1P, or the BM + S1P.

# Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

Fig. 7

Bonnaud et al.



## Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

---

### Figure 7

**PTx pretreatment inhibits S1P-induced endothelial cell survival and small intestines radioprotection**  
(A, B, C) Apoptosis of HMEC-1 treated 2.5 h with 100ng/ml of PTx and 2 h with 1  $\mu$ M S1P prior to 15 Gy. Death evaluation was made 24 h later (A) by cell counting assay (Mean  $\pm$  SD; n = 3 independent experiments), (B) by apo2.7 Facs analysis as apoptotic assay (n=3, one representative facs analysis) and (C) by DEVDase activity (n=3, one representative assay). (D) Survival curves of C57Bl/6 mice after 15 Gy WBR treated with 1  $\mu$ g per 25 g mouse of PTx 2 h and 30 min before and 5 min and 2 h after irradiation and/or 100  $\mu$ g of S1P 30 min before and 5 min after irradiation [vehicle alone (■); S1P alone (●); vehicle + PTx (◆); S1P +PTx (▲)]. Number in parentheses indicates animals per group. (E) H&E-stained duodenum from agonal breathing mice after 15 Gy WBR w/o PTx and/or S1P treatment. (F) Apoptosis in duodenum 4 h after 15 Gy WBR of C57Bl/6 mice treated w/o S1P and w/o PTx. Sections were evaluated for apoptosis using FITC-TUNEL (green) with a DAPI couterstaining (blue). Magnification is 200 x.

# Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

Fig. 8

Bonnaud et al.

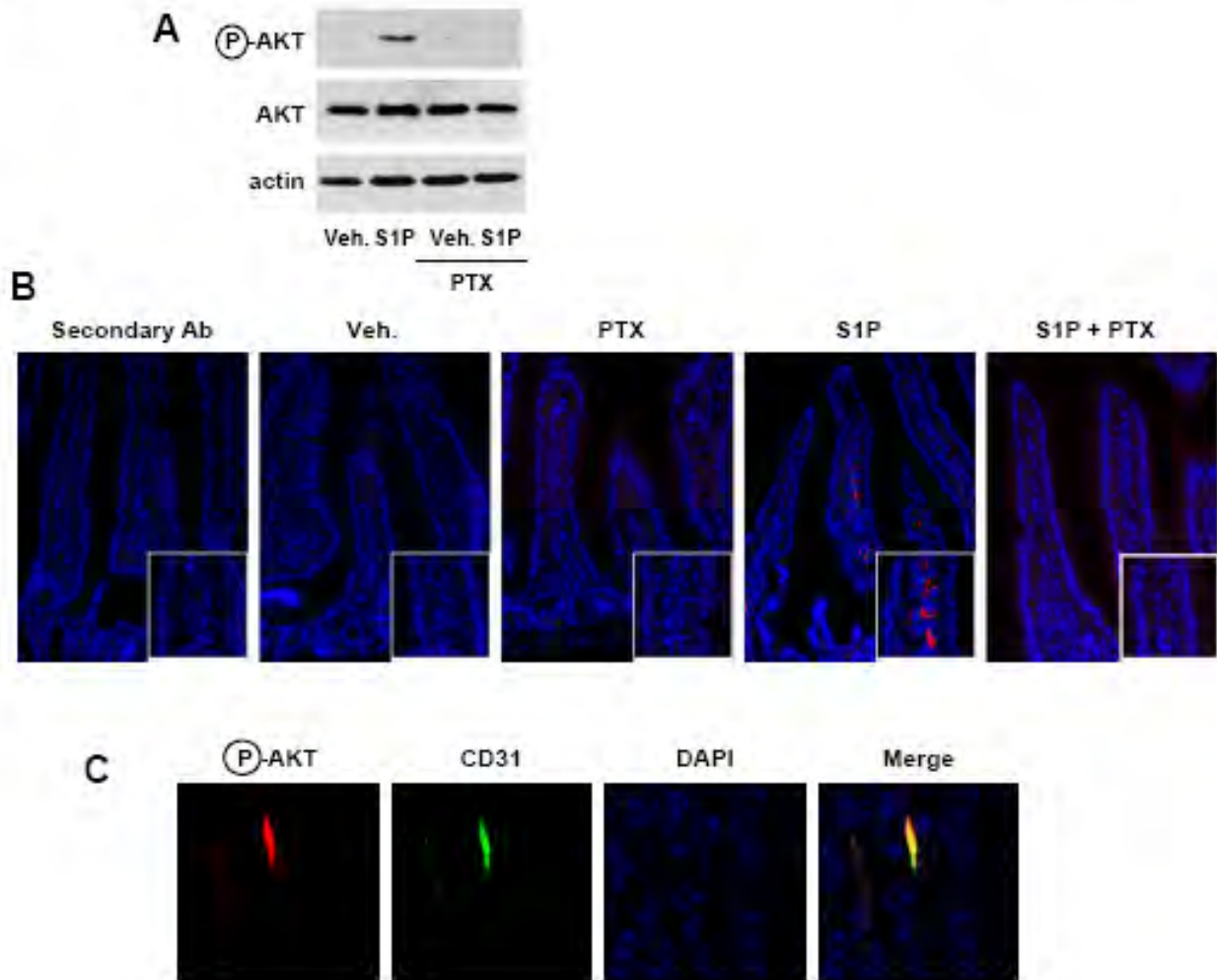


Figure 8

PTx pretreatment inhibits *in vitro* and *in vivo* S1P-induced phospho-AKT (A) Phospho-AKT (P-AKT) expression as compared to total AKT and actin by Western blot. Proteins were extracted from HMEC-1 treated w/o 100ng/ml PTx for 45 min and/or 1 $\mu$ M S1P for 15 min (n=3, one representative blot). (B) P-AKT immunostaining in small intestines sections from mice treated with 1  $\mu$ g per 25 g mouse of PTx 2 h, 45 and 10 min and 100  $\mu$ g S1P 45 min and 10 min before sacrifice. Small intestines were counterstained with DAPI (blue) followed by a indirect fluorescence of primary P-AKT (red) or with control rhodamine- $\alpha$ rabbit IgG. Magnification is 200 X(C) Co-hybridization between FITC- $\alpha$ CD31 and indirect rhodamine-IgG/  $\alpha$ P-AKT. Co-localisation between the endothelial marker (green) and P-AKT (red) is shown by the yellow staining of the merge picture. Magnification was 400 x.

# Résultats : Protection de l'endothélium par administration systémique de la sphingosine-1-phosphate

Fig. 9

Bonnaud et al.

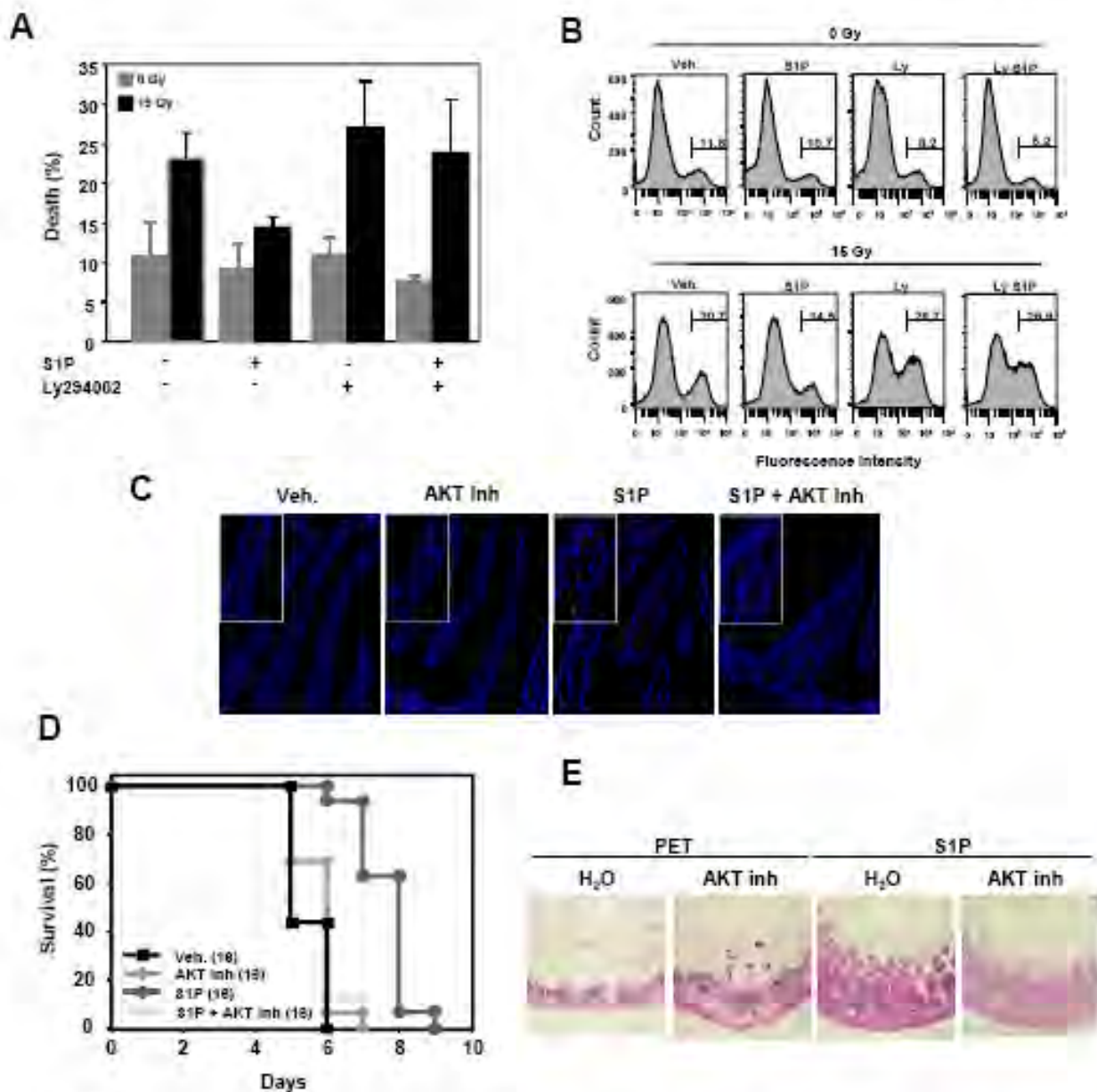


Figure 9:

AKT inhibitor inhibits S1P-induced endothelial cell survival and small intestines radioprotection (A, B) Apoptosis of HMEC-1 treated 3 h with 1  $\mu$ M of Ly294002 and 2 h with 1  $\mu$ M S1P prior to 15 Gy. Cells were then incubated 24 h before death's evaluation by (A) cell counting assay (Mean  $\pm$  SD; n = 3 independent experiments), (B) with apo2.7 FACS analysis as apoptotic assay (n=3, one representative facs analysis). (C) P-AKT immunostaining in small intestines sections from mice treated with 10  $\mu$ g AKT inhibitor per 25 g mouse and/or 100  $\mu$ g S1P 50 min and 15 min before sacrifice. Small intestines were counterstained with DAPI (blue) followed by a indirect fluorescence of primary P-AKT (red). Magnification is 200X. (D) Survival curves of C57Bl/6 mice after 15 Gy WBR treated with 10  $\mu$ g AKT inh per 25 g mouse 30 min before and 5 min after irradiation and/or 100  $\mu$ g S1P 30 min before and 5 min after irradiation [vehicle alone ( $\blacksquare$ ); S1P alone ( $\bullet$ ); vehicle + AKT inhibitor ( $\blacklozenge$ ); S1P+AKT inhibitor ( $\blacktriangle$ )]. Number in parentheses indicates animals per group. (E) H&E-stained of duodenum from agonal breathing mice after 15 Gy WBR w/o AKT inhibitor and/or S1P treatment.

### **III. Autres publications :**

1) La sphingosine-1-phosphate protège les cellules endothéliales de l'apoptose radioinduite :



## Sphingosine-1-Phosphate Protects Proliferating Endothelial Cells from Ceramide-Induced Apoptosis but not from DNA Damage-Induced Mitotic Death

Stéphanie Bonnaud,<sup>1</sup> Colin Niaudet,<sup>1</sup> Géraldine Pottier,<sup>2</sup> Marie-Hélène Gaugler,<sup>1,3</sup> Julie Millour,<sup>1</sup> Jacques Barbet,<sup>1</sup> Laure Sabatier,<sup>2</sup> and François Paris<sup>1</sup>

Département de Recherche en Cancérologie, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U601, Université de Nantes, Faculté des Sciences, Nantes, France; <sup>2</sup>CEA-DSV/DRB/LRG, Laboratoire de Radiobiologie et Oncologie, and <sup>3</sup>Institut de Radioprotection et de Santé Nucléaire, DRPH/SRBE/LRPAT, Fontenay-aux-Roses, France

### Abstract

Because of the central role of the endothelium in tissue homeostasis, protecting the vasculature from radiation-induced death is a major concern in tissue radioprotection. Premitotic apoptosis and mitotic death are two prevalent cell death pathways induced by ionizing radiation. Endothelial cells undergo apoptosis after radiation through generation of the sphingolipid ceramide. However, if mitotic death is known as the established radiation-induced death pathway for cycling eukaryotic cells, direct involvement of mitotic death in proliferating endothelial radiosensitivity has not been clearly shown. In this study, we proved that proliferating human microvascular endothelial cells (HMEC-1) undergo two waves of death after exposure to 15 Gy radiation: an early premitotic apoptosis dependent on ceramide generation and a delayed DNA damage-induced mitotic death. The fact that sphingosine-1-phosphate (S1P), a ceramide antagonist, protects HMEC-1 only from membrane-dependent apoptosis but not from DNA damage-induced mitotic death proves the independence of the two pathways. Furthermore, adding nocodazole, a mitotic inhibitor, to S1P affected both cell death mechanisms and fully prevented radiation-induced death. If our results fit with the standard model in which S1P signaling inhibits ceramide-mediated apoptosis induced by antitumor treatments, such as radiotherapy, they exclude, for the first time, a significant role of S1P-induced molecular survival pathway against mitotic death. Discrimination between ceramide-mediated apoptosis and DNA damage-induced mitotic death may give the opportunity to define a new class of radioprotectors for normal tissues in which quiescent endothelium represents the most sensitive target, while excluding malignant tumor containing proliferating angiogenic endothelial cells that are sensitive to mitotic death. [Cancer Res 2007;67(4):1803-11]

### Introduction

For decades, DNA damage was considered as the principal cause of cell death induced by ionizing radiation. DNA double-strand breaks, which generate chromosomal aberrations, induce mitotic death (e.g., clonogenic or reproductive death). Mitotic death is a slow process occurring after a variable number of cell cycles (1),

characterized by anaphase bridges, exclusion of micronuclei from the nucleus (2), cell enlargement (3), and generation of polyploid cells (4). Besides mitotic death, DNA damage is also involved in radiation-induced apoptosis by initiating signaling pathways that lead to the subsequent induction of a wide range of genes, such as *ATM* (5) or *p53* (6). New developments showed that other cell compartments are also involved in radiosensitivity. Indeed, cell membrane also represents a major target in radiation-induced apoptosis (7). Activation of the acid sphingomyelinase enzyme pool on the outer cell membrane layer potentiates sphingomyelin hydrolysis to ceramide, inducing membrane rearrangement, ruffle formation, and apoptotic signal transduction (8).

By supplying nutrients and oxygen, the endothelium network maintains tissue homeostasis. Vasculature represents a highly differentiated tissue where endothelial cells are quiescent in most of the normal physiologic conditions, except during tissue repair. Endothelium dysfunctions, such as loss of nonproliferating status during tumor angiogenesis, are involved in severe pathologies (9). Because of these physiologic outputs, understanding the death mechanism of the endothelial cell has a genuine relevance. *In vitro* radiosensitivity of endothelial cell has been essentially studied by clonogenic assays (10, 11). If clonogenic assay measures the capacity of the irradiated cell to divide into colony, correlation between clonogenic assay and mortality is partial. Indeed, clonogenic assay is related as much to survival and proliferation as to death, without discriminating the different types of death. New developments in radiobiology, such as generation of transgenic murine models, allowed to better define factors involved in endothelial cell radiosensitivity. *In vitro* (12) and *in vivo* (13) studies showed the crucial roles of acid sphingomyelinase enzyme activation and a rapid ceramide generation in radiation-induced endothelial cell death. Ionizing radiation acts directly on bovine aortic endothelial cell membrane preparations devoid of nuclei, proving that ceramide generation after irradiation is independent of DNA damage and cell cycle regulation induced by DNA double-strand breaks (14). Furthermore, inactivation of *acid sphingomyelinase (asphase)* gene in mice inhibited the radiation-induced endothelial cell apoptosis (15), which leads to tissue response as injury to the central nervous system (16), gastrointestinal syndrome (13), or blood-brain barrier disruption (17). Microvascular apoptosis has also been characterized by tumor response to high-dose radiotherapy. A 15 Gy irradiation of fibrosarcoma or melanoma tumor cells transplanted in mice rapidly induced a massive endothelial cell apoptosis via acid sphingomyelinase activation, which led to tumor regression (18). These results showed the importance of the acid sphingomyelinase and ceramide pair in endothelial cell apoptosis in normal or tumor tissue

Requests for reprints: François Paris, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U601, Institut de Biologie, 9 quai Moncousu, 44093 Nantes cedex 01, France. Phone: 33-2-40-08-47-33. Fax: 33-2-40-35-66-97. E-mail: fparis@univ-nantes.fr.  
©2007 American Association for Cancer Research.  
doi:10.1158/0008-5472.CCR-06-2802

integrity after ionizing radiation, as well as the critical role of endothelial cell in maintenance of normal or tumor integrity. Pharmacologic alteration of the ceramide metabolic pathway should modulate endothelial cell death and tissue response.

Sphingosine-1-phosphate (S1P), a ceramide metabolite, is a bioactive sphingolipid that has been characterized as a potent signal transduction-inducing molecule that exerts diverse biological responses, such as cellular differentiation, hypertrophy, proliferation, migration (19), and cell survival (20). S1P protection mechanisms seem to occur when apoptosis is dependent on ceramide generation (21). Indeed, S1P was shown to protect human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) from C<sub>2</sub>-ceramide-mediated apoptosis (22). *In vivo* studies using C57Bl/6 mouse model showed that S1P pretreatment in ovarian bursa protects mice from chemotherapy- or radiotherapy-induced sterility through inhibition of ceramide-mediated apoptosis in oocytes (23, 24). Ceramide/S1P balance has the capacity to modulate cell apoptosis and tissue radiosensitivity. However, no study has validated the potential protecting effect of S1P on endothelial cells after high-dose radiation.

If previous studies showed that quiescent endothelial cells, found in normal tissue, died by ceramide generation-dependent apoptosis after exposure to high dose of radiation (13, 17, 25, 26), the death mechanisms have not been explored for proliferating endothelial cells, which are present in pathologic tissues such as tumor angiogenesis. In this study, we propose to investigate the contribution of two major death pathways (i.e., DNA damage-induced mitotic death and ceramide generation-induced apoptosis) involved in radiosensitivity status of the proliferating endothelial cell. Because of its radioprotective effects in several cell models toward a large spectrum of stresses, the involvement of S1P in protecting proliferating endothelial cells will be more specifically studied in these two major radiosensitive pathways.

## Materials and Methods

### Cell Culture and Treatments

Human microvascular endothelial cells (HMEC-1) were kindly provided by F.J. Candal (Center for Disease Control, Atlanta, GA; ref. 27). HMEC-1 cells were seeded at a density of 20,000/cm<sup>2</sup> and allowed to reach subconfluence for 5 days in MCDB 131 medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 15% FCS, 10 ng/mL epidermal growth factor, 2 µg/mL hydrocortisone, 2 mmol/L L-glutamine, 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin, referred to as endothelial cell complete medium.

Irradiations of subconfluent HMEC-1 cells were carried out in a Faxitron CP160 irradiator (Faxitron X-ray Corporation, Buffalo Grove, IL) at a dose rate of 1.48 Gy/min and a total dose between 2 and 30 Gy. Two hours before irradiation, cell medium was changed to low-serum medium (MCDB 131 medium supplemented with 0.1% FCS, 2 µg/mL hydrocortisone, 2 mmol/L L-glutamine, 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin). Different pharmacologic drugs were added to the low-serum medium 2 h before irradiation: 1 µmol/L fumonisin B1 (Biomol, Philadelphia, PA) or 1 µmol/L S1P (Biomol; prepared as previously described in ref. 23). Exceptions were made for desipramine (50 µmol/L; Sigma-Aldrich, St. Quentin-Favier, France), which was added 15 min before irradiation and removed 1 h after, and nocodazole (0.1 µg/mL; Sigma-Aldrich), which was added 24 h after radiation for another 24 h.

### Detection of Apoptosis

**Cell counting assay.** As previously described (28), apoptotic fraction was calculated by taking the ratio of floating cell number to total cell number (floating + adherent). Floating cell population represented the nonadherent cells in the culture medium, and loosely adherent cells were derived from

two PBS washes of the monolayer. Adherent cells were trypsinized. Cell number of both fractions was determined using Malassez slides.

**Detection of apoptotic marker Apo2.7.** Apo2.7 (7A6 antigen) has been described as a mitochondrial marker of apoptosis (29). Adherent and floating cells, either pooled or not, were washed twice with PBS, and labeled with the monoclonal antibody (mAb) anti-Apo2.7-phycoerythrin (clone 2.7A6A3) according to the supplier's recommendations (Immunotech, Marseilles, France). Acquisitions were done on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), and data were analyzed using CellQuest software (BD Biosciences).

### Cell Cycle Analysis

**[<sup>3</sup>H]thymidine incorporation.** Sixteen hours after irradiation, HMEC-1 cells were incubated with low-serum medium containing [<sup>3</sup>H]thymidine (1 µCi/mL) for 8 h. Cells were then trypsinized and harvested with a Titertek cell harvester (Flow Laboratories, Rickmansworth, United Kingdom) on glass fiber filter (Wallac Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France). Cells were then dried and incubated with Betaplate scintillation liquid (Wallac Perkin-Elmer). β Radioactivity was counted by using a scintillation spectrometer (Wallac Perkin-Elmer). [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation was analyzed with the Microbeta Windows Workstation software (Wallac Perkin-Elmer).

**Propidium iodide staining.** Floating and adherent cells were pooled, washed with PBS, fixed in 70% ethanol for 20 min at -20°C, and stained with 40 µg/mL propidium iodide (Sigma-Aldrich) and 100 µg/mL RNase (Qiagen, Courtaboeuf, France) for 30 min at 37°C in the dark. Cell cycle phases were quantified using Flow Jo software (Tree Star, Ashland, OR).

### DNA Damage Assessment

**Detection of phosphorylated histone H2AX.** For the detection of DNA double-strand breaks after irradiation, staining for phosphorylated H2AX (γH2AX) was conducted as described previously (30). Cells were trypsinized, washed with PBS, and fixed in 70% ethanol overnight at -20°C. Cells were rehydrated for 10 min in PBS/4% FCS/0.1% Triton X-100, and resuspended in 200 µL of mouse mAb against γH2AX (clone JBW301; Euro-medex, Mundolsheim, France; 1:500 dilution in PBS/2% FCS/0.1% Triton X-100) for 2 h at room temperature. Cells were washed in PBS/2% FCS/0.1% Triton X-100 and resuspended in secondary antibody, a phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse IgG F(ab)<sub>2</sub> fragment (Beckman Coulter, Roissy, France; 1:100 dilution in PBS/2% FCS/0.1% Triton X-100) for 1 h at room temperature. Cells were washed and resuspended in 20 µg/mL 7-aminocoumarin D (Sigma-Aldrich) before analysis with a BD FACSAria Bioanalyser (BD Biosciences). Analyses of flow cytometry data were conducted using CellQuest software.

**Cytogenetic analyses.** Twenty-two hours 30 min after 15 Gy irradiation, colchicine (0.1 µg/mL; Sigma-Aldrich) was added for 1 h 30 min before collecting the cells. Then, cultures were trypsinized and suspended in hypotonic solution (0.075 mol/L KCl), incubated for 20 min at 37°C, and fixed in methanol/acetic acid (3:1). Cell suspensions were dropped on slides and dried. Slides were processed according to the fluorochrome plus Giemsa method by Perry and Wolff (31) to score mitotic index (percentage of metaphase), chromosomal aberrations, and number of cell divisions done posttreatment. Cell culture duration postirradiation was determined to score chromosomal aberrations exclusively from the first division. Telomeres were detected by a (C3TA2)βPNA-Cy3 probe (Perceptive Biosystem, Boston, MA), whereas centromeres were detected by a Pan-centromere probe (Cambio, Cambridge, United Kingdom). Hybridized metaphases were captured with a charge coupled device camera (Zeiss, Jena, Germany) coupled to a Zeiss Axioplan microscope and were processed with the ISIS software (MetaSystems, Altlußheim, Germany). At least 100 metaphases were examined for each sample. We scored chromosome rearrangements, such as dicentric or multivalent, rings, and excess acentrics (i.e., we did not score the acentric generated with one dicentric chromosome). To determine the number of breaks per metaphase, the number of breaks per type of aberration was assigned as follows: one dicentric (two breaks), one trivalent (four breaks), one quadrivalent (six breaks), one pentavalent (eight breaks), one ring (two breaks), and one minute or one acentric (one break).

**Detection of micronuclei.** Floating and adherent cells were pooled 48 h after 15 Gy irradiation, washed with PBS, spread on slides with a Cytospin (Thermo Electron Corp., Waltham, MA) at 800 rpm for 2 min, fixed in paraformaldehyde (0.5%) for 30 min, and permeabilized with Triton X-100 (0.1% in PBS) for 10 min. Slides were washed twice with PBS, incubated in 5 µg/mL propidium iodide (Sigma-Aldrich) and 1 mg/mL RNase (Qiagen) for 1 h at 37°C in the dark, and rinsed in 10 mmol/L Tris. Cells were visualized with a ×400 lens on a fluorescent microscope (Axiovert 200-M; Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

**Statistical Analysis**

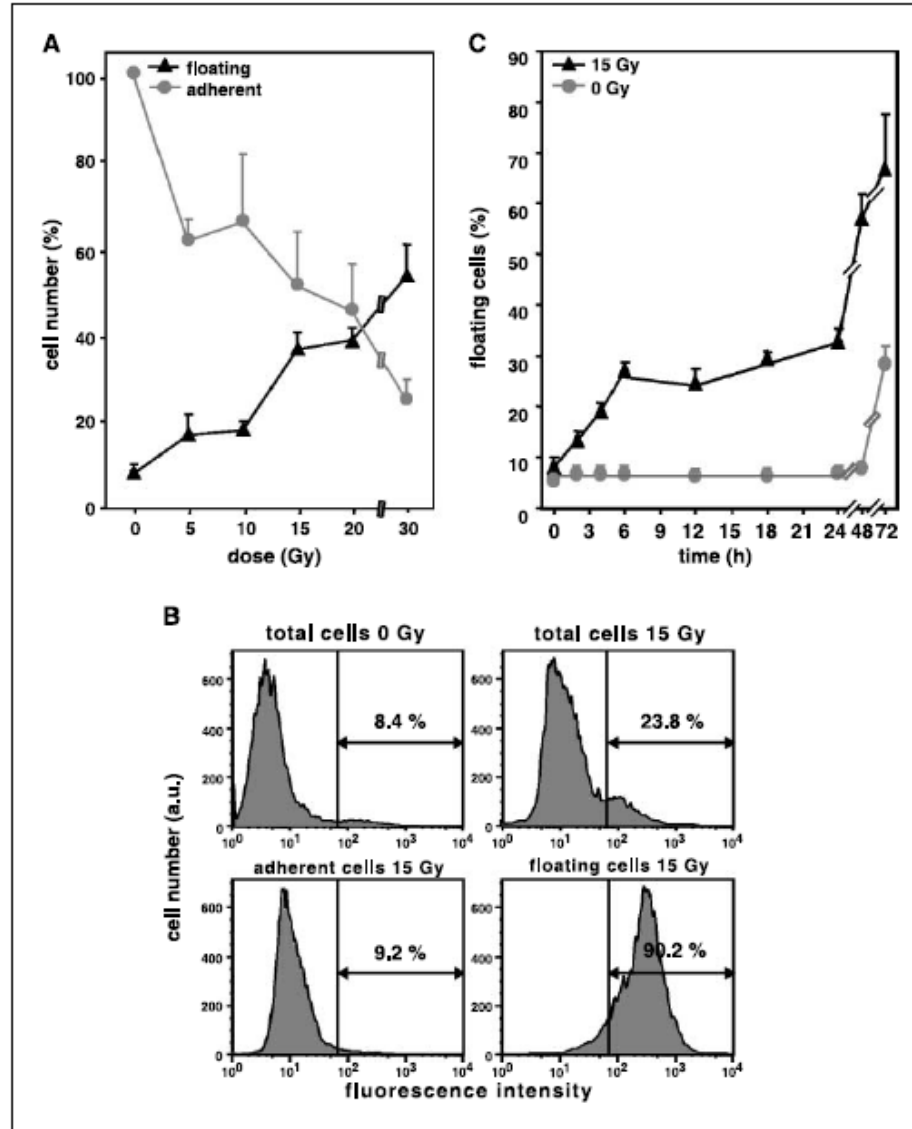
All values were reported as mean ± SD or SE as indicated. Data were analyzed using the Student's *t* test or the Mann-Whitney test (SIGMASTAT software, Jandel Scientific, Erkrath, Germany). Differences were considered as significant at *P* < 0.05 unless indicated otherwise.

**Results**

**Irradiation induces endothelial cell apoptosis in a dose- and time-dependent manner.** Exposure of subconfluent HMEC-1 to

X-rays results in a dose- and time-dependent decrease in the number of adherent cells and increase in the number of floating cells. Twenty-four hours after radiation, 38.3 ± 4.9%, 48.6 ± 12.2%, and 75.2 ± 4.9% less adherent cells were quantified, respectively, in 5, 15, or 30 Gy irradiated cells compared with unirradiated cells. Floating cells in the culture medium increased with dose. Compared with control, 2-, 4.5-, and 6.5-fold higher floating cells were quantified in 5, 15, or 30 Gy conditions, respectively (Fig. 1A). The single dose of 15 Gy is chosen for the rest of the study because of the physiologic relevance of endothelial cell apoptosis after irradiation at high dose (13). The use of the apoptotic mitochondrial marker Apo2.7 confirms the induction of apoptotic cells after radiation (23.8% apoptotic cells 24 h after 15 Gy versus 8.4% for control; Fig. 1B). Furthermore, the fact that 90.2% of the floating cells are Apo2.7 positive validated our cell counting assay as an apoptotic assay (Fig. 1B). Similar to the dose-dependent quantification of endothelial cell death, we follow the generation of apoptotic HMEC-1 cells as a function of time. After a single 15 Gy

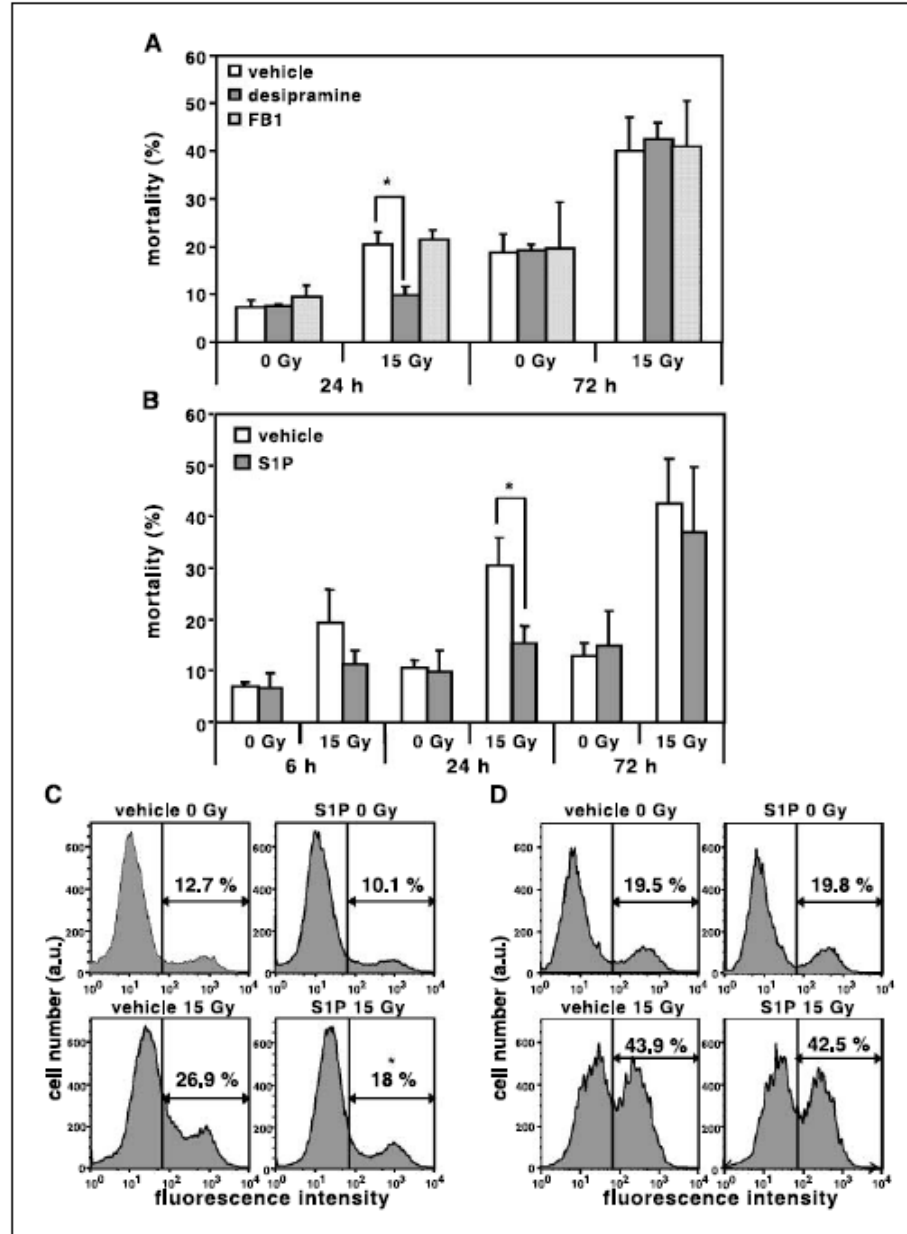
**Figure 1.** Irradiation induces endothelial cell apoptosis *in vitro* in a dose- and time-dependent manner. **A**, floating (▲) and adherent (●) cell number counts from subconfluent HMEC-1 24 h after exposure to 0, 5, 10, 15, 20, and 30 Gy. Y-axis, % [floating cells / (floating cells + adherent cells)] at each dose for the floating cell curve and % [(adherent cells at x Gy) / (adherent cells at 0 Gy)] for the adherent cell curve. Points, mean from at least three independent experiments; bars, SE. **B**, determination of apoptotic cell death done by flow cytometry using apoptotic marker Apo2.7 24 h after 15 Gy irradiation. Original data from one of three experiments. **C**, apoptotic cell counting assay of unirradiated (●) and irradiated (▲) HMEC-1 incubated 0, 2, 4, 6, 12, 18, 24, 48, and 72 h after 15 Gy radiation exposure. Values are mean ± SD from three to eight independent experiments (*P* < 0.001).



irradiation, two waves of floating cells were observed: the first one reached a plateau at 25% of apoptotic cells 6 h postirradiation until 24 h; the second one started 24 h postirradiation increasing to  $66 \pm 20.2\%$  of floating cells at 72 h (Fig. 1C) and reaching a peak of  $>86\%$  at 92 h (data not shown).

**Inhibition of ceramide pathway by S1P or desipramine blocks early apoptosis but not late death.** To confirm that radiation-induced apoptosis in HMEC-1 cells is mediated by acid sphingomyelinase activation-induced ceramide generation, as shown in endothelial cells *in vivo* in the central nervous system (16) or in gastrointestinal syndrome (13), experiments were carried out using the acid sphingomyelinase inhibitor desipramine. Apoptotic counting assay done 24 h postirradiation shows that

50  $\mu\text{mol/L}$  desipramine pretreatment significantly decreased apoptosis by 52.4%, compared with the 15 Gy control ( $P = 0.003$ ), to background level of nonirradiated cells (Fig. 2A). Nevertheless, desipramine treatment does not inhibit the late apoptosis observed at 72 h during the second wave of death ( $39.4 \pm 1.4\%$  of apoptosis for control and  $42.5 \pm 1.4\%$  for desipramine-treated cells;  $P > 0.1$ ). Besides the acid sphingomyelinase pathway, *de novo* biosynthesis by ceramide synthase represents another major ceramide generation pathway activated in endothelial cells after radiation (26, 32). To evaluate the specificity of the acid sphingomyelinase pathway, the ceramide synthase inhibitor fumonisin B1 was used. We observed no difference between radiation-induced apoptosis of  $1 \mu\text{mol/L}$  fumonisin B1-treated HMEC-1 and untreated cells, 24 and



**Figure 2.** Inhibition of ceramide pathway by S1P blocks early apoptosis but not late death. A, comparison of apoptotic cell counting assay of HMEC-1 24 h after exposure to 15 Gy radiation treated either with 50  $\mu\text{mol/L}$  desipramine (filled columns), 1  $\mu\text{mol/L}$  fumonisin B1 treatment (shaded columns), or control (empty columns). Columns, mean from two independent experiments carried out in triplicate; bars, SD ( $P < 0.005$ ). B, apoptotic cell counting of 1  $\mu\text{mol/L}$  S1P-pretreated (filled columns) or vehicle-pretreated (empty columns) HMEC-1 incubated for 6, 24, and 72 h after exposure to 15 Gy radiation. Columns, mean from three independent experiments; bars, SD ( $P < 0.05$ ). C and D, determination of apoptotic cell death done by flow cytometry using the apoptotic marker Apo2.7 of 15 Gy irradiated HMEC-1 incubated 24 h (C) or 72 h (D). Values are mean  $\pm$  SE from three independent experiments done in duplicate ( $P \leq 0.001$ ). Original FACS data from one of three experiments.

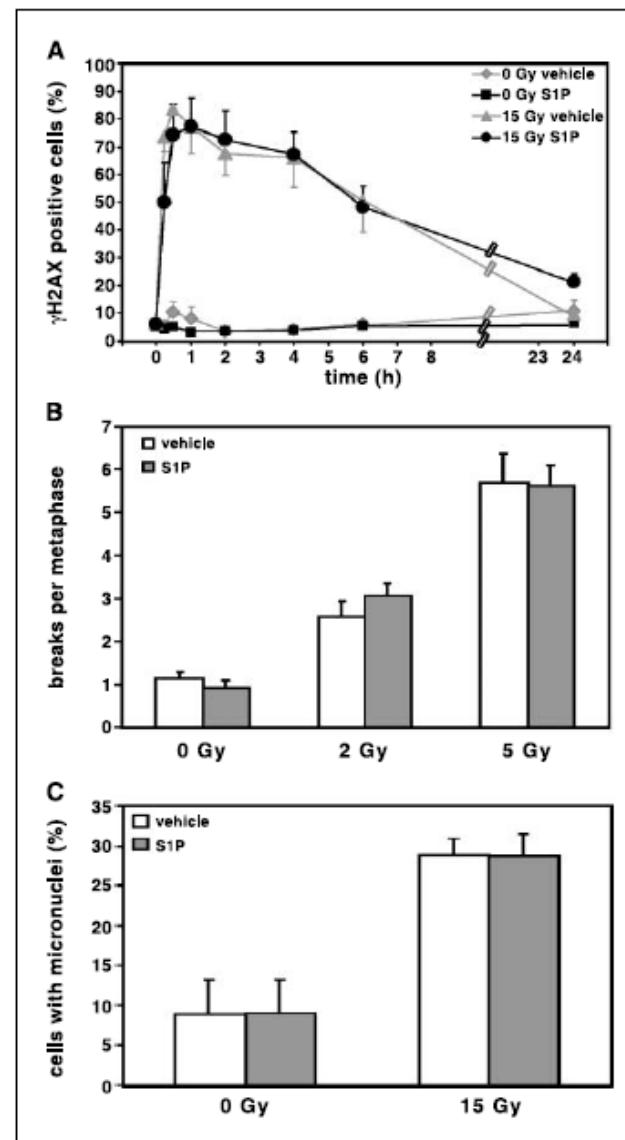
72 h after 15 Gy irradiation (Fig. 2A), proving the major role of the acid sphingomyelinase and ceramide pair in HMEC-1 early radiosensitivity.

Because of the ceramide/S1P rheostat model, we investigated if S1P could protect HMEC-1 from radiation-induced apoptosis mediated by ceramide generation. Two hours of pretreatment with 1  $\mu\text{mol/L}$  S1P lowered the number of apoptotic cells by 2-fold, 24 h after 15 Gy, nearly to the background level ( $30.5 \pm 5.2\%$  of apoptosis for control and  $15.3 \pm 3.4\%$  for S1P-treated cells,  $P = 0.013$ ; Fig. 2B). Apo2.7 staining (Fig. 2C) and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling (TUNEL) assay (data not shown) confirmed S1P radioprotection, which pointed out a significant 33.3% and 21.2% decrease in apoptotic HMEC-1 cell percentage in 15 Gy irradiated condition pretreated with 1  $\mu\text{mol/L}$  S1P compared with the 15 Gy control, respectively. The specificity of the S1P radioprotection was determined by dihydro-S1P, a sphingolipid related to S1P. Indeed, 2 h of 1  $\mu\text{mol/L}$  dihydro-S1P pretreatment does not inhibit the HMEC-1 apoptosis rate 24 h after 15 Gy (data not shown).

Although S1P inhibits radiation-induced apoptosis in HMEC-1 cells 24 h after radiation, protection by S1P is not effective in the late death wave. Indeed, no statistical difference in floating cell counting assay was found 72 h after 15 Gy irradiation between the S1P-treated and untreated conditions ( $36.9 \pm 12.8\%$  for S1P-treated group versus  $42.7 \pm 8.5\%$  for vehicle-treated group;  $P > 0.5$ ; Fig. 2B). Results are confirmed by Apo2.7 staining (Fig. 2D). After exposure to 15 Gy radiation, we observed percentages of death of 43.9% for control and 42.5% for S1P-pretreated cells.

**S1P does not protect HMEC-1 from DNA damage and mitotic catastrophe.** The fact that desipramine or S1P has no action on late death shows that the second wave of death is independent of acid sphingomyelinase activation-induced ceramide generation and membrane signaling. DNA damage-induced cell death is also a major cell death pathway after X-ray radiation (33). Cells containing  $\gamma\text{H2AX}$  foci (each focus represents a single DNA double-strand break) were quantified by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis as a function of time, irradiation, and S1P treatment. Maximum  $\gamma\text{H2AX}$ -positive cell ratio was observed within the window between 30 min and 1 h after exposure to 15 Gy radiation ( $83.2 \pm 6.7\%$  in sham condition versus  $74.3 \pm 11.2\%$  in S1P condition 30 min postradiation,  $P > 0.5$ ; Fig. 3A). Furthermore, no difference in the mean of fluorescence intensity, representing the number of foci per cell, was observed at the different time points of the experiment (data not shown). Similar kinetic profiles of DNA double-strand break induction and their repair, represented by the increase and the decrease of  $\gamma\text{H2AX}$ -positive cells, respectively, were observed in HMEC-1 cells treated or not by S1P (Fig. 3A).

Irradiation-induced DNA double-strand breaks leads to chromosomal rearrangements, mitotic catastrophe, and death. Radiation-induced chromosomal damage, quantified by the number of chromosomal breaks per metaphase, was studied 24 h after exposure to radiation. Because of the high level of cell death and low level of metaphases observed after exposure to 15 Gy radiation, chromosomal breaks per metaphase were analyzed in HMEC-1 cells irradiated at 0, 2, and 5 Gy. First, we observed that the percentage of breaks per metaphase increased in a dose-dependent manner, independent of treatment with S1P or its vehicle (0 Gy,  $P = 0.5$ ; 2 Gy,  $P > 0.3$ ; 5 Gy,  $P > 0.5$ ; Fig. 3B). Furthermore, no difference in quality of breaks, such as multicentric, acentric, and minute chromosomal damages, was observed in irradiated



**Figure 3.** S1P does not protect HMEC-1 from DNA damage and mitotic catastrophe. **A**, labeling for DNA damage foci with mAb against  $\gamma\text{H2AX}$  of HMEC-1 treated with 1  $\mu\text{mol/L}$  S1P (●) or vehicle (▲) before exposure to 15 Gy radiation. Labeling occurs 0, 15, or 30 min, and 1, 2, 4, 6, or 24 h postradiation. Points, mean from four independent experiments done in duplicate or triplicate; bars, SE. **B**, chromosomal breaks of 1  $\mu\text{mol/L}$  S1P-pretreated (filled columns) or vehicle-pretreated (empty columns) HMEC-1 in metaphase by colchicine treatment exposed 24 h after 15 Gy radiation exposure. Columns, mean of 100 metaphases analyzed per condition; bars, SE. **C**, micronuclei formation of 1  $\mu\text{mol/L}$  S1P-pretreated or vehicle-pretreated HMEC-1 exposed 48 h after 15 Gy radiation exposure. Columns, mean from four independent experiments with 200 nuclei per experiment; bars, SD.

condition with or without S1P incubation (data not shown). Experiments carried out at 10 and 15 Gy irradiation showed the same rate and types of breaks per metaphase tendencies when HMEC-1 cells were treated with S1P or its vehicle (data not shown; metaphase number is too small for statistical distribution).

Severe chromosomal damage fails to produce correct chromosomal segregation after mitosis, which results in micronuclei exclusion and leads to mitotic death (1). To assess the mechanism

of death during the second-wave postirradiation, micronuclei formation was quantified 48 h after exposure to 15 Gy radiation. A 3.3-fold increase of cells with one or more micronuclei was observed after radiation compared with nonirradiated cells, proving that the late death represents cells that are dying by mitotic death (Fig. 3C). Furthermore, pretreatment with S1P does not inhibit the amount of cells with one or more micronuclei after irradiation [S1P + 15 Gy treatment ( $28.8 \pm 2.1\%$ ) versus 15 Gy treatment ( $28.7 \pm 2.7\%$ );  $P > 0.9$ ; Fig. 3C].

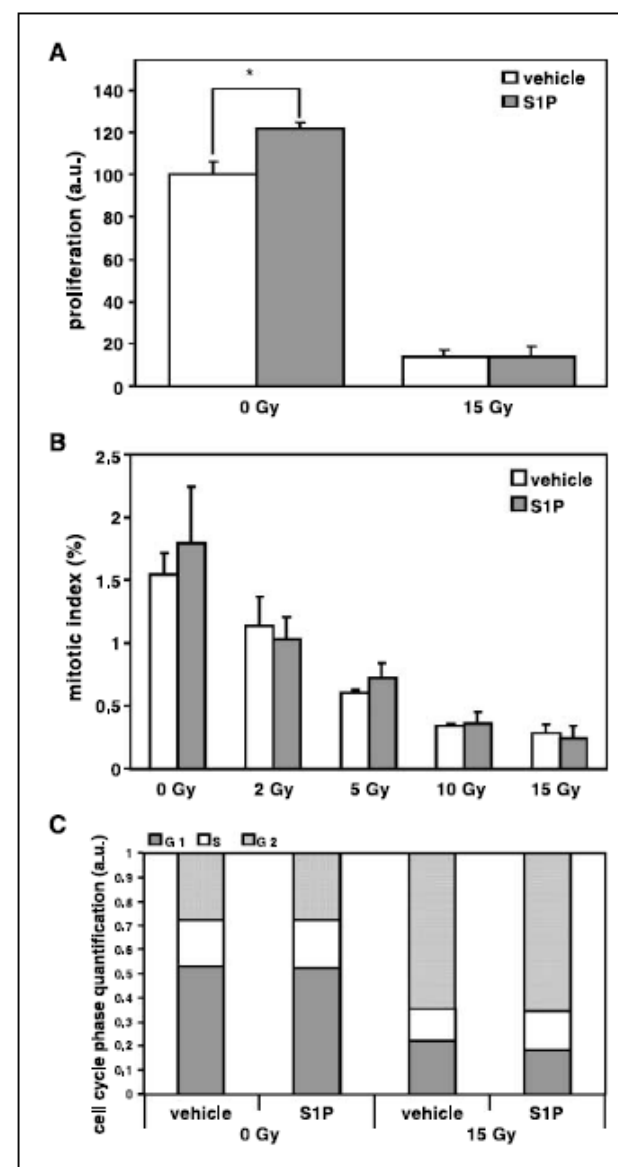
**S1P does not modulate cell cycle inhibition involved in mitotic death.** Mitotic death is considered to be a slow process occurring after a variable number of cell cycles (34). To confirm the nonprotective effect of S1P during the mitotic death wave, proliferation and regulation of cell cycle were studied after radiation. First, we ensured that S1P radioprotection into the first wave of apoptotic death is not due to an upsurge of endothelial cell proliferation using [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation assay. In nonirradiated HMEC-1 cells, 24 h after S1P treatment, proliferation increased by 1.2-fold compared with untreated cells, confirming the proangiogenic action of S1P (Fig. 4A; ref. 35). However, after 15 Gy irradiation, cell proliferation decreased by 7.3- and 8.9-fold for sham- and S1P-treated cells, respectively, but no difference between vehicle or S1P-treated cell proliferation was observed ( $P > 0.8$ ; Fig. 4A). Results were confirmed by analysis of mitotic index. Twenty-four hours after a dose range of 2 to 15 Gy, HMEC-1 mitotic index decreased in a dose-dependent manner. No statistical difference between S1P-treated cell mitotic index and control was observed (for 15 Gy,  $P > 0.7$ ; Fig. 4B).

Cell cycle distribution 24 h after 15 Gy irradiation was examined by propidium iodide incorporation (Fig. 4C). Unirradiated cultures maintained a typical cell cycle distribution of asynchronous populations ( $G_1$ ,  $41 \pm 6.8\%$  for control and  $43.4 \pm 4.6\%$  for S1P;  $S$ ,  $15.8 \pm 8\%$  for control and  $18.4 \pm 6.1\%$  for S1P;  $G_2\text{-M}$ ,  $23.1 \pm 11.2\%$  for control and  $19.6 \pm 4.8\%$  for S1P). As already been shown, irradiation-induced  $G_2\text{-M}$  arrest was observed in HMEC-1 since 6 h postirradiation. Moreover, S1P does not modulate the efficiency or the kinetic of the  $G_2\text{-M}$  cell cycle control after irradiation. Twenty-four hours after exposure to 15 Gy radiation,  $48.2 \pm 8.2\%$  of the control cells were arrested in  $G_2\text{-M}$  versus  $50 \pm 5.5\%$  for S1P-treated cells (Fig. 4C;  $P > 0.6$ ).

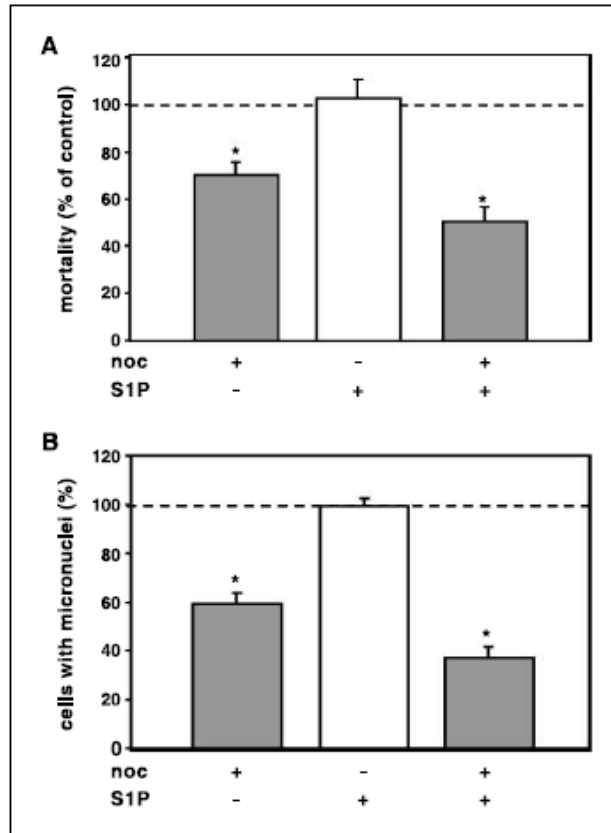
**Combination of S1P and nocodazole treatments highly protects proliferating endothelial cell by inhibiting ceramide apoptotic pathway and mitotic death, respectively.** Because cell cycle has to be processed to develop mitotic death, we used nocodazole, which inhibits microtubule formation, to block or delay mitotic death. Forty-eight hours after 15 Gy irradiation, 30.6% decreased cell death was observed in nocodazole-treated HMEC-1 compared with control cells (Fig. 5A). S1P treatment showed no significant difference between S1P or sham-treated irradiated cells, thus confirming data shown in Fig. 2B and D ( $P > 0.2$ ; Fig. 5A). To further validate that HMEC-1 radiation-induced death involves two different mechanisms (e.g., ceramide-mediated apoptosis and DNA damage-mediated mitotic death), HMEC-1 were treated with S1P before irradiation and with nocodazole after irradiation. Enhancements of radioprotection by 2- and 1.5-fold were observed when 15 Gy irradiated HMEC-1 cells were treated by S1P + nocodazole ( $P \leq 0.001$ ) and by nocodazole alone ( $P \leq 0.001$ ; Fig. 5A), respectively.

Because of their involvement in mitotic death, micronuclei incidence was determined in irradiated HMEC-1 to validate the protection by dual S1P + nocodazole treatments (Fig. 5B). First, as

expected, treatment by S1P did not modify the incidence of micronuclei in irradiated HMEC-1 ( $P > 0.9$ ; Fig. 5B). Moreover, cell population irradiated and treated with nocodazole contains 40.5% fewer cells with micronuclei compared with control ( $P = 0.004$ ; Fig. 5B). Better radioprotection was observed when cells were treated with S1P and nocodazole together. In this condition, incidence of cells with micronuclei decreased to 37.5% compared with untreated cells ( $P \leq 0.001$ ; Fig. 5B).



**Figure 4.** S1P does not modify cell cycle inhibition involved in mitotic catastrophe. A, S1P-treated (filled columns) and vehicle-treated (empty columns) HMEC-1 proliferation 24 h after 15 Gy irradiation done using [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation. Columns, mean from five independent experiments; bars, SD. B, mitotic index of S1P pretreatment (filled columns) or sham control cells (empty columns) HMEC-1 after 0, 2, 5, 10, and 15 Gy irradiation. Columns, mean from three independent experiments with 1,000 nuclei per experiment; bars, SD. C, cell cycle analysis using Flow Jo software after propidium iodide staining. Columns, mean from four independent experiments done in duplicate.



**Figure 5.** Arrest of ceramide pathway by S1P and mitotic catastrophe by nocodazole inhibit radiation-induced endothelial cell death. **A**, 15 Gy irradiated HMEC-1 treated 2 h before irradiation with 1  $\mu\text{mol/L}$  S1P and 24 h postirradiation with 0.1  $\mu\text{g/mL}$  nocodazole, and stained 48 h postirradiation with apoptotic marker Apo2.7. *Columns*, mean from four independent experiments done in duplicate or triplicate; *bars*, SE. **B**, micronuclei formation after 48 h of 15 Gy irradiated HMEC-1 treated 2 h before irradiation with 1  $\mu\text{mol/L}$  S1P and 24 h postirradiation with 0.1  $\mu\text{g/mL}$  nocodazole. *Columns*, mean from four independent experiments with 200 nuclei per experiment; *bars*, SD.

**Discussion**

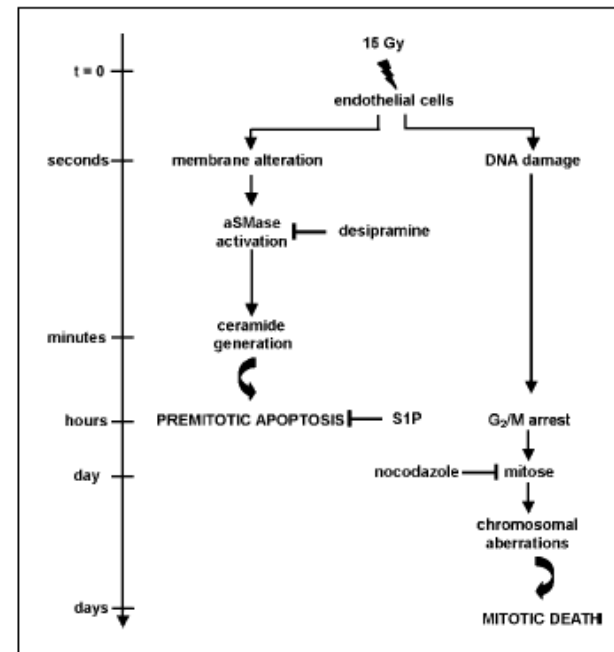
The effect of endothelial cell radiosensitivity in tissue damage and tumor regression to high-dose radiation has been previously described (13, 18, 36). Confluent endothelial cells have been shown to die after radiation through generation of proapoptotic factor ceramide (14). However, if mitotic death represents the established radiation-induced death pathway for most dividing eukaryotic cells, involvement of mitotic death in proliferating endothelial cell radiosensitivity has not been distinctly shown. In this study, we prove that proliferating endothelial cells undergo mitotic death if ceramide-mediated death is inhibited by S1P (Fig. 6).

Apoptotic cell count, Apo2.7 staining, and TUNEL assay of irradiated HMEC-1 cells showed that HMEC-1 radiosensitivity comprises two waves of death. The first wave of death, between 0 and 24 h postirradiation, depended on acid sphingomyelinase activation and ceramide generation because desipramine treatment was able to inhibit this early endothelial death. The second wave of death occurring 24 h after radiation was insensitive to desipramine treatment and thus independent of acid sphingomyelinase/ceramide apoptotic pathway (Fig. 6). Chromosomal aberrations

studies and micronuclei assays correlated the second wave of death with DNA damage generation and mitotic death, the definitive involvement of which was proven by inhibition of late cell death by nocodazole, a mitosis inhibitor.

DNA damage triggers molecular pathways controlled by key molecular node, especially ceramide synthase and p53. In bovine aortic endothelial cells, fumonisin B1 blocked X-ray-induced death through inhibition of ceramide synthase, making it an attractive target to explain our late cell death phenomenon (32). In our endothelial cell model, maximum tolerated dose of fumonisin B1 was not able to inhibit the second wave of death, meaning that ceramide synthase activation does not seem to be involved in radiation-induced HMEC-1 mitotic death. The major discrepancy between Liao's study and ours is the proliferation status of the endothelial cells. X-ray experiments in bovine aortic endothelial cells have been realized using quiescent endothelial cells, excluding the mitotic death analysis, whereas our experiments allowed use of proliferating HMEC-1 cells to study the involvement of mitotic death and its molecular factors in endothelial cell radiosensitivity.

HMEC-1 cells are immortalized with SV40 large T-antigen, which inactivates p53 and might modify DNA damage-induced apoptosis and cell cycle arrest. However, previous results have shown that acid sphingomyelinase- and ceramide-mediated apoptosis induced in microvascular endothelium was independent of p53 status. At the difference of inactivation of *asmase* gene, disruption of p53 in mice neither modified high-dose radiation-induced endothelial cell apoptosis inside the lamina propria and around the crypt nor inhibited small intestine necrosis or animal death timing (13). Our first wave of death in HMEC-1 is dependent on acid sphingomyelinase activation and ceramide generation, in which SV40 is not known to be interfering with. Mitotic death occurs after cell cycle G<sub>2</sub> arrest. If p53 is known to regulate cell cycle after ionizing



**Figure 6.** Schematic sequence of molecular events leading to ceramide-mediated premitotic apoptosis and DNA damage-induced mitotic death.

radiation, especially by inducing G<sub>1</sub> arrest through increase of p21 expression, different studies also showed that X-ray-induced apoptosis occurring after G<sub>2</sub> arrest might be independent of p53 (37–39). We ultimately prove the relevance of the two waves of death by confirming data obtained in the SV40-immortalized endothelial cell, in human primary macrovascular endothelial cells. Indeed, SIP is able to protect human primary macrovascular endothelial cells from the first wave of radiation toxicity at 24 h but not from the second wave of death observed at 72 h (data not shown), as shown in HMEC-1. Further studies will help to better understand the molecular pathways involved in the second wave of death.

Pretreatment of HMEC-1 with a therapeutic relevant dose of SIP protects against early apoptosis, which is dependent on ceramide generation induced by radiation exposure, but not the late death, which is dependent on DNA damage. Moreover, SIP action in irradiated HMEC-1 cells seems specific, because other sphingolipids, such as dihydro-SIP, do not enhance radioprotection (data not shown). A key function of SIP is to mediate vascular growth by enhancing endothelial cell proliferation. This proproliferative action of SIP could explain its radioprotective activity. This survival mechanism has already been embodied by lovastatin, a lipid-lowering molecule, which inhibits HUVEC radiosensitivity at late time point after radiation, partially by an increase of endothelial cell proliferation (40). Our results using [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation or mitotic index analysis showed that SIP does not protect microvascular endothelial cell by an upsurge of proliferation (Fig. 4A and B). Apo2.7 apoptotic staining definitely proves direct inhibition of ceramide-mediated apoptosis by SIP treatment (Fig. 2C). Our results fit with the main dogma of the "ceramide/SIP rheostat," which determines the death and survival status of cells exposed to lethal stress (41). Moreover, our study is the first one to show the pharmacologic input of SIP in modulation of microvascular endothelial cell apoptosis after exposure to a high dose of ionizing radiation.

To understand the absence of SIP protection toward mitotic death, we wondered if SIP interfered with DNA damage-controlled pathway. We first studied the rate of loss of  $\gamma$ H2AX, a phosphorylated histone localized in a DNA repair foci (42). The fact that SIP- or vehicle-treated cells throughout expressed a similar percentage of cells with foci and a similar average number of foci per cell (mean value) proves that SIP pretreatment does not affect the rate of DNA double-strand breaks induced by ionizing radiation and does not confer an enhancement of repair machinery. Because insufficiently repaired or misrepaired double-strand breaks might lead to chromosome breaks, deletions, and translocations (43), we also analyzed the percentage of breaks per metaphase with respect to the ionizing radiation dose. SIP pretreatment did not modulate the rate of breaks by metaphase (quantitative analysis) or the types of breaks, such as ring, acentric, and multicentric (qualitative analysis), induced by increasing dose of ionizing radiation (Fig. 3B; and data not shown).

Chromosomal abnormalities, appearance of micronuclei, and cell cycle modulation, which we all validated in our endothelial cell model, are the main characteristic events of mitotic death (1). Furthermore, mitotic death requires a transient G<sub>2</sub>-M arrest and also takes a longer incubation period (>24 h) until execution of cell death compared with premitotic apoptosis (39). As previously shown by Khodarev et al. (11), we also observed by propidium iodide staining the strong G<sub>2</sub>-M arrest and the dead cells in sub-G<sub>1</sub> phase 48 h postradiation, characteristic of the mitotic death.

Mitotic death was thought to be exhibited mainly by non-hematopoietic cell lineages, although the involvement of mitotic death in proliferating endothelial cell radiosensitivity has not been clearly shown, except when endothelial cells are irradiated after angiostatin pretreatment (10).

Modulating the early ceramide-dependent death by SIP and the late DNA damage-dependent death by nocodazole affected proliferating endothelial cell death after radiation and showed the independence of the two waves of death. Compared with sham-irradiated cells, SIP pretreatment does not reduce the amount of cells with micronuclei, a mitotic death marker, explaining the high level of mitotic death observed 48 h postradiation in both conditions. Differences in late death and micronuclei rates (Fig. 5A and B, respectively) between nocodazole-treated and SIP + nocodazole-treated irradiated cells are explained by the fact that SIP and nocodazole treatment gives an additive protection, whereas nocodazole treatment prevents or delays endothelial cell only from late death. Other studies already showed that SIP protects cells from genotoxic agents (21, 23, 24, 44). However, none of these studies were able to discriminate protection due to inhibition of ceramide-mediated apoptosis from the one dependent on DNA damage radiosensitivity. Our extensive study on proliferating endothelial cell death after radiation represents the first study to exclude SIP radioprotection from the process involving interaction with DNA repair machinery or cell cycle modulation.

As recently pointed out (45), SIP metabolism has taken center stage in cancer development and treatment. High expression of sphingosine kinase 1, an enzyme transforming sphingosine to SIP, in tumor cell was correlated with low patient survival (46). Treatment of nude mice by sphingosine kinase 1 inhibitors reduced gastric and mammary adenocarcinoma tumor growth (47). Neutralizing by mAb, the pathophysiologic SIP secreted by cancer cells and platelets in the serum delayed the growth of the tumor by preventing angiogenesis (48). Thus, chronic secretion of SIP appears to play a major role in tumorigenesis by protecting tumor cells and by enhancing microvascularization induced by other key proangiogenic growth factors [vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor (bFGF); ref. 45]. These protumoral sides of SIP are counterbalanced by the fact that SIP radioprotection, at a therapeutic, single, relevant low dose, is specific on ceramide-dependent endothelial cell apoptosis. This offers a promising approach for pharmacologically improving the radioprotection of normal tissues. Indeed, adult normal tissue vasculature is quiescent (49) because of the equilibrium between angiogenic promoters and inhibitors (9). Because of this non-proliferative status of endothelial cells, DNA damage-induced mitotic death cannot be the main observable type of death, explaining why endothelial cells died exclusively by the acid sphingomyelinase/ceramide-mediated apoptosis: acid sphingomyelinase knockout mice have an endothelium resistant to ionizing radiation in brain, lung, and intestine tissues compared with wild-type mice or knockout mice for DNA damage-sensing factors, such as DNA-PK, ATM, or p53 (13, 16, 26). Like bFGF injection, SIP treatment should modulate ceramide in endothelial cells *in vivo* and protect normal tissues from radiation-induced toxicity. However, pathologic endothelial cells have the capacity to divide (9). This proliferating status opens the door to mitotic death, which SIP is not able to block. All of these important biological issues warrant more intensive future *in vivo* investigation. Mitotic death induced by radiotherapies and most of the chemotherapies are developed to target essentially cells with high proliferating



capacity. Our data prove that S1P radioprotection is only due to inhibition of acid sphingomyelinase/ceramide-mediated apoptosis. In this circumstance, S1P protection will not be ubiquitous. Therefore, selective protection by S1P of early apoptosis but not mitotic death may give the opportunity to define a selective radioprotector for normal tissues, in which quiescent endothelial cells represent the most sensitive target, but not tumor containing endothelial cells with high proliferating characteristics, which will be sensitive to mitotic death.

## Acknowledgments

Received 7/28/2006; revised 10/13/2006; accepted 12/10/2006.

**Grant support:** Commission of the European Communities, Association Contract F16R-CT-2003-508842 RISC-RAD, and ACI «jeunes chercheuses-jeunes chercheurs». S. Bonnard's Ph.D. fellowship was assumed by Association pour la Recherche sur le Cancer and a grant of Region Pays de la Loire and CEA.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank Dr. I. Corre for critical review of the manuscript.

## References

- Roninson IB, Broude EV, Chang BD. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* 2001;4:303-13.
- Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;33:781-96.
- Lock RB, Ross WE. Possible role for p34cdc2 kinase in etoposide-induced cell death of Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 1990;50:3767-71.
- Muller WU, Nüsse M, Miller BM, Slavotinek A, Viaggi S, Streffer C. Micronuclei: a biological indicator of radiation damage. *Mutat Res* 1996;366:163-9.
- Cortez D, Guntuku S, Qin J, Elledge SJ. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* 2001;294:1713-6.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004;73:39-85.
- Hannun YA. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 1996;274:1855-9.
- Gulbins E, Li PL. Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;290:R11-26.
- Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005;438:932-6.
- Han D, Beckett MA, Sukhatme VP, et al. Angiostatin induces mitotic cell death of proliferating endothelial cells. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000;3277-82.
- Khodarev NN, Kataoka Y, Murley JS, Weichselbaum RR, Grdina DJ. Interaction of amifostine and ionizing radiation on transcriptional patterns of apoptotic genes expressed in human microvascular endothelial cells (HMEC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;60:553-3.
- Haimovitz-Friedman A, Balaban N, McLoughlin M, et al. Protein kinase C mediates basic fibroblast growth factor protection of endothelial cells against radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 1994;54:2591-7.
- Paris F, Fuks Z, Kang A, et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 2001;293:293-7.
- Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Elleiter D, et al. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med* 1994;180:525-5.
- Santana P, Pena LA, Haimovitz-Friedman A, et al. Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* 1996;86:189-99.
- Pena LA, Fuks Z, Kolesnick RN. Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency. *Cancer Res* 2000;60:321-7.
- Li YQ, Chen P, Haimovitz-Friedman A, Reilly RM, Wong CS. Endothelial apoptosis initiates acute blood-brain barrier disruption after ionizing radiation. *Cancer Res* 2003;63:5950-6.
- García-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* 2003;300:1155-9.
- Hla T. Signaling and biological actions of sphingosine 1-phosphate. *Pharmacol Res* 2003;47:401-7.
- Olivera A, Rosenfeldt HM, Bektas M, et al. Sphingosine kinase type 1 induces G12/13-mediated stress fiber formation, yet promotes growth and survival independent of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 2003;278:46452-60.
- Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, et al. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 1996;381:800-3.
- Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, et al. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 1999;99:301-12.
- Morita Y, Perez GI, Paris F, et al. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat Med* 2006;11:109-14.
- Paris F, Perez GI, Fuks Z, et al. Sphingosine 1-phosphate preserves fertility in irradiated female mice without propagating genomic damage in offspring. *Nat Med* 2002;8:901-2.
- Maj JG, Paris F, Haimovitz-Friedman A, Venkatraman E, Kolesnick R, Fuks Z. Microvascular function regulates intestinal crypt response to radiation. *Cancer Res* 2003;63:4338-41.
- Chiang HJ, Maj JG, Paris F, et al. ATM regulates target switching to escalating doses of radiation in the intestines. *Nat Med* 2005;11:484-90.
- Ades EW, Candal FJ, Swerick RA, et al. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 1992;99:683-90.
- Lawrence TS, Davis MA, Hough A, Rehemtulla A. The role of apoptosis in 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine (gemcitabine)-mediated radiosensitization. *Clin Cancer Res* 2001;7:314-9.
- Zhang C, Ao Z, Seth A, Schlossman SF. A mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells. *J Immunol* 1996;157:3980-7.
- Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with  $\gamma$ -H2AX antibody. *Radiat Res* 2002;158:486-92.
- Perry P, Wolff S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 1974;251:156-8.
- Liao WC, Haimovitz-Friedman A, Persaud RS, et al. Ataxia telangiectasia-mutated gene product inhibits DNA damage-induced apoptosis via ceramide synthase. *J Biol Chem* 1999;274:17908-17.
- Valerie K, Povirk LF. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* 2003;22:5792-812.
- Ross GM. Induction of cell death by radiotherapy. *Endocr Relat Cancer* 1999;6:41-4.
- Licht T, Tsurinikov L, Reuveni H, Yarnitzky T, Ben-Sasson SA. Induction of pro-angiogenic signaling by a synthetic peptide derived from the second intracellular loop of SIP3 (EDG3). *Blood* 2003;102:2099-107.
- Cho CH, Kammerer RA, Lee HJ, et al. Designed angiopoietin-1 variant, COMP-Ang1, protects against radiation-induced endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:5553-8.
- Chang WP, Little JB. Delayed reproductive death in X-irradiated Chinese hamster ovary cells. *Int J Radiat Biol* 1991;60:483-96.
- Iwamoto K, Shinomiya N, Mochizuki H. Different cell cycle mechanisms between UV-induced and X-ray-induced apoptosis in WDR colorectal carcinoma cells. *Apoptosis* 1999;4:59-66.
- Shinomiya N. New concepts in radiation-induced apoptosis: "premitotic apoptosis" and "postmitotic apoptosis". *J Cell Mol Med* 2001;5:240-53.
- Nubel T, Damrot J, Roos WP, Kaina B, Fritz G. Lovastatin protects human endothelial cells from killing by ionizing radiation without impairing induction and repair of DNA double-strand breaks. *Clin Cancer Res* 2006;12:933-9.
- Maceyka M, Payne SG, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002;1585:193-201.
- MacPhail SH, Banath JP, Yu TY, Chu EH, Lambur H, Olive PL. Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. *Int J Radiat Biol* 2003;79:351-8.
- Dasika GK, Lin SC, Zhao S, Sung P, Tomkinson A, Lee EY. DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* 1999;18:7883-99.
- Ojala M, Suomalainen L, Pentikainen MO, et al. Protection from radiation-induced male germ cell loss by sphingosine-1-phosphate. *Biol Reprod* 2004;70:759-67.
- Milstien S, Spiegel S. Targeting sphingosine-1-phosphate: a novel avenue for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2006;9:148-50.
- Van Brocklyn JR, Jackson CA, Pearl DK, Kotur MS, Snyder PJ, Prior TW. 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* 2005;64:695-705.
- French KJ, Schreengost RS, Lee BD, et al. Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Res* 2003;63:5962-9.
- Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, et al. Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell* 2006;9:225-38.
- Hobson B, Denekamp J. Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer* 1984;49:405-13.

### 2) Evaluation de la toxicité et de l'efficacité d'un traitement combiné entre radioimmunothérapie et traitement anti-angiogénique

**Comparative toxicity and efficacy of combined radioimmunotherapy and antiangiogenic therapy in CEA-expressing medullary thyroid cancer xenograft**

**Corresponding author:** Françoise Kraeber-Bodéré Cancer Research Center CRCNA, Inserm UMR892, Institut de Biologie, 9 quai Moncousu, 44093 Nantes Cédex 1, France. phone: (33) 2 40 08 47 47 Fax: (33) 2 40 35 66 97 francoise.bodere@chu-nantes.fr

**Running title:** Antiangiogenic agents increase RIT efficacy **Word count:** Abstract 434 words, Text 5163 words

**Key Words:** radioimmunotherapy, antiangiogenic therapy, medullary thyroid cancer, thalidomide, vascular endothelial growth inhibitor

Françoise Kraeber-Bodéré<sup>1,2,3</sup>, Caroline Bodet-Milin<sup>1,2</sup>, Colin Niaudet<sup>1</sup>, Catherine Saï-Maurel<sup>1</sup>, Anne Moreau<sup>4</sup>, Alain Faivre-Chauvet<sup>1,2</sup>, Patrick Thomare<sup>5</sup>, Gerard Deleris<sup>6</sup>, Karine Estieu-Gionnet<sup>6</sup>, Andréas Bikfalvi<sup>7</sup>, Jacques Barbet<sup>1</sup>, François Paris<sup>1</sup>.

1. Cancer Research Center, Inserm, Université de Nantes, UMR892, Nantes, France
2. Nuclear Medicine Department, Hotel Dieu University Hospital, Nantes, France
3. Nuclear Medicine Department, René Gauducheau Cancer Center, Nantes, France
4. Anatomopathology Department, Hotel Dieu University Hospital, Nantes, France
5. Pharmacy Department, Hotel Dieu University Hospital, Nantes, France
6. CNRS UMR5084 CNAB, Bordeaux, France
7. INSERM Research UMR920, Bordeaux, France

### ABSTRACT

A significant anti-tumor effect was previously observed with radioimmunotherapy (RIT) using anti-CEA <sup>131</sup>I-F6 monoclonal antibody in medullary thyroid cancer (MTC)-bearing nude mice. Nevertheless, no complete response was observed. As seen with chemotherapy, drugs targeting the tumor microenvironment might improve RIT efficacy. This study evaluated toxicity and efficacy of combining RIT with thalidomine or a cyclopeptidic vascular endothelial growth inhibitor (aka. cycloVEGi or CBOP11) in mice grafted with the TT human MTC cell line. **Methods:** 6 to 10 nude mice treated with 92.5 MBq of <sup>131</sup>I-F6 in association w/o 200 mg/kg/day of thalidomide during 20 days by force-feeding or 0.45 mg/kg/day of CBOP11 during 25 days using subcutaneous minipumps were compared to control mice receiving either treatment or naked F6 or nonspecific <sup>131</sup>I-734. Combined therapies associated <sup>131</sup>I-F6 at day 0 followed by thalidomide between day 20 and 40, thalidomide between day 0 and 20 followed by <sup>131</sup>I-F6 at day 25, <sup>131</sup>I-F6 at day 0 and CBOP11 between day 0 and 25, CBOP11 between day 0 and 25 followed by <sup>131</sup>I-F6 at day 25 and <sup>131</sup>I-F6 at day 0 followed by CBOP11 between day 20 and 45. Animal weight, hematological toxicity, tumor volume and serum calcitonin (Ct) were monitored for the following 3 months. Improvement of <sup>125</sup>I-F6 tumor biodistribution by antiangiogenic drug was studied after pre-treatment by thalidomide. Follow-up of the tumor after combined antiangiogenic and RIT therapies were performed by histology studies. **Results:** Combined associations increased leucopenia, but not thrombocytopenia, as compared to RIT alone. Tumor volume quadrupling time (TVQT) was 22.8 ± 3.3 days in the control group, 29.9 ± 3.6 days in the group treated with thalidomide, 34.6 ± 4.4 days in the group treated with CBOP11 and 51.0 ± 2.8 days after RIT alone. As compared to RIT, TVQT was significantly longer (p<0.01) after thalidomide followed by RIT (69.83 ± 3.9), CBOP11 followed by RIT (71.3 ± 6.1) and CBOP11/RIT in concomitance (64.2 ± 6.1). Nevertheless, TVQT was not increased after RIT followed by thalidomide (48.8 ± 4) and RIT followed by CBOP11 (56.8 ± 4.8). Surprisingly, pretreatment by CBOP11 or thalidomide sensitized larger tumors (>300 mm<sup>3</sup>) to RIT.

Change in Ct levels confirmed morphological tumor response. Tumor uptake 24 h after injection of <sup>125</sup>I-F6 was respectively 4.5 ± 0.6 % and 8.7 ± 1.3 %ID/g w/o pretreatment by thalidomide. Increase of the anti-tumor effect observed using antiangiogenic drug combined with RIT was correlated with a decrease of blood vessels showed by Van Willebrand immunostaining. **Conclusion:** Pretreatment with antiangiogenic therapies improved RIT efficacy, with acceptable toxicity. Future investigations will be performed to understand how antiangiogenic agents sensitize large tumors to RIT.

Radioimmunotherapy (RIT) is a validated therapeutic modality for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. Several clinical studies have shown high response rates for both myeloablative and nonmyeloablative activities in patients with recurrent or refractory lymphoma [1, 2]. For more radiation resistant solid tumors requiring higher tumor absorbed dose, RIT efficacy is actually restricted to residual disease stages, indolent type of carcinoma, with repeated courses of RIT or with therapy combining RIT and radiosensitizing chemotherapeutic agents [3-6]. Angiogenesis (sprouting of new microvasculature from existing blood vessels) is critical to sustain the nutrient and oxygen supply during tumor growth and metastatic spreading of most malignant neoplasms [7,8]. In its absence, tumors cannot grow beyond 1 to 2 mm because diffusion of oxygen and nutrients limits their size. Direct correlations between density of micro-vessels, metastases and survival of patients have been shown [9-11]. Moreover, our recent works showed that tumor regression after external high dose radiotherapy is dependent on endothelial apoptosis and tumor vasculature necrosis [12]. Then, pharmacological inhibition of tumor endothelium growth combined with RIT against tumor cells will target different cellular components and may give a gain of beneficence in the treatment of solid tumors. Medullary thyroid carcinoma (MTC) is a neuroendocrine tumor representing about 10% of all thyroid cancers. As MTC tumor expresses and secretes carcinoembryonic antigen (CEA), it constitutes a potential application for RIT with anti-CEA antibodies [13]. Our group demonstrated the efficacy of RIT in the treatment of MTC in animal model or in phase I/II clinical trials [14-17]. Nevertheless, RIT efficacy must be improved, in particular in cases of aggressive form or large tumor masses. Moreover, MTC appeared a good model to study combinations of anti-angiogenic treatment and RIT, because of the sensitivity of neuroendocrine tumors to the antiangiogenic treatments [18].

### INTRODUCTION

The purpose of the present study was to assess the efficacy and toxicity of combined antiangiogenic therapy and anti-CEA RIT in nude mice grafted with a human MTC cell line. Two different antiangiogenic drugs have been evaluated: thalidomide which induces apoptosis of endothelial cells and a cyclopeptidic vascular endothelial growth inhibitor (CBOP11) which inhibits VEGF-induced endothelial cells proliferation [19, 20]. A significant part of the study focused on the determination of the best relative timing for RIT and antiangiogenic treatment.

**MATERIELS AND METHODS Cell line.** The TT line of human MTC obtained from the ATCC (Rockville, MD) for use in this study expresses CEA on its cell membrane and secretes TCT. It was cultured as adherent-cell monolayers in RPMI medium (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France) to which was added 10% fetal calf serum (FCS; Gibco BRL), 1% glutamine (L-glutamine 200 MM; Gibco BRL) and 1% antibiotic (penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 U/ml; Gibco BRL).

**Animal model.** Nude mice over 10 weeks of age were purchased from Janvier (L'arbresle, France). Mice were housed at the animal core facility of the Cancer Research Center. This facility is approved by the French Association for Accreditation of Laboratory Animal Care and is maintained in accordance with the regulations and standards of INSERM and the French Department of Agriculture. Mice were grafted subcutaneously in the right flank with  $10^6$  TT cells in 0.3 ml of sterile normal saline solution. The animals were housed in aseptic conditions. Lugol's solution 0.1% was added to drinking water (1 ml/100 ml) the week before and then 2 weeks after injection of the radioiodinated mAb.

**Antibody, Labeling and Controls.** The reference antibody was an anti-CEA F(ab')<sub>2</sub> fragment designated F6. This mouse IgG1 antibody, used as the F(ab')<sub>2</sub> fragment, was purchased from Immunotech SA (France). The F(ab')<sub>2</sub> fragment of nonspecific 734 antibody (Immunotech SA, France) was used as control. The antibody was labeled using iodogen as described by Fraker et al. [21]. The specific activity of the iodine-131 radiolabeled antibody, measured using an ionization chamber (Medi-202; Medisystème; France), ranged from 180 to 350 MBq/mg for the different preparations. The radiochemical purity, as determined by thin-layer chromatography on ITLC-SG chromatography paper (Gelman; Ann Arbor; USA), was always above 98%. The immunoreactivity, assessed using anti-idiotypic antibody 44-12-13 (kindly provided by Immunotech SA, France), was 85 to 96%.

## Résultats : autres publications

**Experimental RIT and antiangiogenic treatment.** Groups of 6-12 mice each were studied. The different treatment procedures are summarized in Figure 1. Two groups with initial tumor volume of  $101 \pm 32$  and  $383 \pm 180$  mm<sup>3</sup> (large tumors) were injected respectively with 92.5 MBq (250 µg) of <sup>131</sup>I-F6 fragment. MAb diluted in 0.2 ml of sterile normal saline solution was injected intravenously into the lateral tail vein. The maximal tolerated dose (MTD) of RIT, determined in a preliminary study, was 92.5 MBq (unpublished results). Two antiangiogenic agents were used in this study. Thalidomide was in suspension in Hydroxy-Propyl-Methyl-Cellulose E4M Premium grade 2910 (Colorcon). CBOP11, an antagonist of VEGF, was diluted in normal saline solution. Two groups were treated with 200 mg/kg/day of thalidomide during 20 days by force-feeding or with 0.45 mg/kg/day of CBOP11 during 25 days using subcutaneous 2004 Alzet osmotic minipump (Zilberberg JBC 2003). Initial tumor volumes in these groups were respectively  $99 \pm 58$  and  $92 \pm 38$  mm<sup>3</sup>. Combined therapies associated <sup>131</sup>I-F6 at day 0 followed by thalidomide between day 20 and 40, thalidomide between day 0 and 20 followed by <sup>131</sup>I-F6 RIT at day 25; <sup>131</sup>I-F6 at day 0 and CBOP11 between day 0 and 25, CBOP11 between day 0 and 25 followed by <sup>131</sup>I-F6 RIT at day 25 and finally <sup>131</sup>I-F6 at day 0 followed by CBOP11 between day 20 and 45. Initial tumor volumes in these groups were respectively  $78 \pm 36$ ,  $87 \pm 49$ ,  $108 \pm 56$ ,  $102 \pm 35$  and  $88 \pm 31$  mm<sup>3</sup>. In the 2 groups with large tumors treated by antiangiogenic agent (thalidomide or CBOP11) followed by RIT, tumor volume was respectively  $502 \pm 201$  and  $383 \pm 142$  mm<sup>3</sup> when RIT was administered. Treatment group including injection of <sup>131</sup>I-F6 at day 0 in parallel to thalidomide between day 0 and 20 was technically not possible to handle, because of incapacity to force-feed the highly radioactive mice the first seven days after the RIT. Two control groups were treated with 92.5 MBq non specific <sup>131</sup>I-734 and 250 µg naked F6. The initial volumes of these two groups were respectively  $113 \pm 55$  and  $228 \pm 94$  mm<sup>3</sup>. Finally, a control group of 12 mice received no treatment. Tumor Length (L), width (W) and thickness (T) were measured with a sliding caliper twice weekly for 150 days. Tumor volume (V) was calculated according to the formula:  $V = L \times W \times T \times 0,5$ . All animals were weighed on the day of injection and then twice a week for 90 days. Biological monitoring was performed on a blood sample drawn from the inner border of the eye. The parameters used to evaluate the toxicity of each type of treatment were maximal weight loss and variation in the number of leukocytes and platelets measured on day 0, 15, 30, 45 and 60. The parameters used to evaluate the efficacy of each type of treatment were tumor volume quadrupling time (TVQT) or tumor volume doubling time (TVDT) and the variation in serum calcitonin (Ct) concentration measured by radioimmunoassay on day 0, 30, 60 and 90 (Ct immunoradiometric assay, CIS Bio international, Gif sur Yvette, France). Data are expressed as the ratio between Ct serum level at a given time after treatment initiation and the value measured just prior treatment.

**Biodistribution study.** In the aim to understand mechanism underlying effect of pre-treatment using antiangiogenic agent, biodistribution studies were compared in mice injected with <sup>125</sup>I-F6 (37 kBq, 30 µg) w/o pretreatment using thalidomide (thalidomide between day 0 and 20 followed by <sup>125</sup>I-F6 at day 25). Biodistribution was assessed at 24 and 72 hours (3 mice per time point). Tumor and organs were removed and weighed and then the radioactivity was counted by a gamma counter. The results were expressed as % ID/g.

**Histological study.** Histological analysis of tumors treated with RIT and/or antiangiogenic drugs was performed at day 15, 30, 45 and > 60 to establish overall tumor morphology and specific markers of anti-tumor efficacy. After harvesting, tumors were fixed in 4% formol, embedded in paraffin, cut into 4-micrometers sections. Degree of cellular pleomorphism was studied by hemalumeosin-safran staining and necrosis was estimated by cell size and density, the nucleocytoplasmic ratio, the appearance of chromatin and the size of nucleoli. Cellular reactivity with anti-CEA MAb was studied by an indirect immunoperoxidase staining. Tumor cell proliferation was assessed by hybridization with Ki67 antibody (MIB-1 clone, Dako). Degree of tumor cell proliferation after treatment was estimated in function of the

## Résultats : autres publications

---

tumor proliferation without treatment. Endothelium vasculature was assessed by hybridization with anti-van Willebrand factor (polyclonal anti-rabbit, Dako) and compared to the tumor vasculature without treatment.

**Statistical analysis.** Owing to the limited number of animals, the means for the quantitative variables of the different groups were compared using nonparametric tests (the Mann-Whitney U test for comparison of two groups and the Kruskal-Wallis test for comparison of more than two groups). P values  $\leq 0.05$  were considered significant. BMDP Statistical Software, Version 7.0 (Cork, Ireland) was used for the analysis.

### RESULTS Treatment toxicity

No significant weight loss was observed in mice treated with the different treatments (<8% in all treated groups vs. control). In untreated controls, the mean leukocyte concentration was  $2,700 / \text{mm}^3$  (range 800-7,000) and that of platelets  $1.4 \cdot 10^6 / \text{mm}^3$  (range 0.57-2.7  $\cdot 10^6$ ). Toxicity on leukocytes and platelets was expressed as the percentage of the concentration relative to basal value (Table 1). Percentages between 70 and 130% were considered as normal. When significant decrease of blood counts was observed at day 60, additional counting was performed at day 75. No significant leucopenia was observed after thalidomide. After RIT alone and CBOP11, leucopenia nadir was observed at day 15 with respectively  $41 \pm 21\%$  and  $41 \pm 25\%$  of initial concentration and the concentration was restored by day 30. In the group treated by thalidomide followed by RIT, the nadir was observed at day 45 ( $26 \pm 26\%$ ) and leukocyte counts were restored at day 60 and, in the group treated by RIT followed by thalidomide, at day 15 ( $34 \pm 24\%$ ) with recovery at day 30. This leucopenia was related to RIT. In the group treated by CBOP11 followed by RIT, the nadir was observed at Day 30 ( $41 \pm 19\%$ ) with recovery at day 75, in the group treated by RIT and CBOP11 in concomitance at day 15 ( $29 \pm 27\%$ ) with recovery at day 45. In the group injected by RIT followed by CBOP11, leucopenia was observed at day 15 ( $43 \pm 22\%$ ) with recovery at day 45. A moderate thrombocytopenia was observed at day 15 after RIT, RIT followed by thalidomide and RIT followed by CBOP11 (Table 1). Platelet counts were restored at day 30. In the other groups, no thrombocytopenia was observed. A significant increase of platelet concentration was noted after RIT (days 45 and 60), thalidomide followed by RIT (day 30), CBOP11 followed by RIT (days 30) and RIT and CBOP11 in concomitance (days 45 and 60). After reaching the nadir, hematopoiesis was restored spontaneously in all groups of mice. Two animal death (D20 and D52 after injection of  $^{131}\text{I}$ -734) was recorded during the monitoring period.

The death occurring at D20 was related to leucopenia, the other that occurred later was related to infection (as verified by histological study at autopsy).

### Efficacy of the combination of Thalidomide and $^{131}\text{I}$ -F6

Thalidomide and  $^{131}\text{I}$ -F6 were evaluated as single modality therapeutic agents and in combination. Figures 2 and 3A show the TT tumors growth curves after various treatment regimens and in the control groups. A rapid tumor growth was observed in the three control groups. TVQT was  $22.8 \pm 3.3$  days in the non-treated control group,  $29.9 \pm 3.6$  days in the group treated with thalidomide and  $51.0 \pm 2.8$  days after RIT alone (Figure 4). As compared to RIT value, TVQT was significantly longer ( $p < 0.01$ ) after thalidomide followed by RIT ( $74.1 \pm 5.2$ ). Nevertheless, TVQT was not increased after RIT followed by thalidomide ( $54.5 \pm 6.8$ ) (Figure 6). Changes in Ct concentrations were parallel to those in tumor volumes (Figure 3B). In the control group, the ratio of Ct concentration to pre-treatment value increased rapidly and was correlated to tumor size. This ratio was  $4.09 \pm 1.46$  at day 30. RIT had a strong biological effect with a ratio of  $0.59 \pm 0.31$  at day 30. Using thalidomide alone, a moderate effect was observed with a ratio of  $1.39 \pm 0.93$  at day 30. Thalidomide followed by RIT allowed a prolonged biological effect, with ratios of  $1.04 \pm 0.9$ ,  $1.02 \pm 0.69$  and  $1.3 \pm 0.63$  at day 30, 60 and 90 respectively. RIT followed by thalidomide slightly delayed the increase of Ct concentrations as compared to the group treated only by RIT.

### Efficacy of the combination of CBOP11 and $^{131}\text{I}$ -F6

CBOP11 and  $^{131}\text{I}$ -F6 were evaluated as single modality therapeutic agents and in combination (Figures 4A and 4B). TVQT was  $34.6 \pm 4.4$  days in the group treated with CBOP11 alone (Figure 6). As compared to RIT value ( $51.0 \pm 2.8$  days), TVQT was significantly longer after CBOP11 followed by RIT ( $74.0 \pm 13.1$ ) and CBOP11 and RIT in concomitance ( $60.2 \pm 4.7$ ) ( $p < 0.01$ ). TVQT was not increased when CBOP11 was given after RIT ( $56.8 \pm 4.8$ ).

## Résultats : autres publications

---

Changes in Ct concentrations were parallel to those in tumor volume (Figure 4B). Using CBOP11 alone, a small effect was observed with ratio of  $2.07 \pm 1.17$  at day 30. Treatments using CBOP11 followed by RIT or combined with RIT achieved a prolonged biological effect. Ratios at day 90 were  $1.54 \pm 0.29$  and  $1.88 \pm 0.12$  respectively. When RIT was followed by CBOP11, a slight effect was observed with a ratio at day 60  $4.15 \pm 1.71$ .

### Efficacy of the combination of antiangiogenic treatment and $^{131}\text{I}$ -F6 on large tumors

Figures 5A and B show the growth curves and change in Ct levels of TT large tumors ( $>300 \text{ mm}^3$ ). Day 0 represents the day of RIT administration. Pretreatment by CBOP11 or thalidomide sensitized large tumor to RIT. TVDT of large tumors untreated or treated by RIT were respectively  $12.2 \pm 6.37$  and  $25.5 \pm 6.13$ . The value was significantly increased when RIT followed thalidomide ( $57.66 \pm 10.6$ ) and CBOP11 ( $59.4 \pm 2.51$ ) ( $p < 0.01$  vs. RIT). Change in Ct levels confirmed morphological tumor response. Ratios at day 60 were  $3.75 \pm 1.1$  in the control group,  $4.80 \pm 1.15$  in the group treated by RIT,  $1.10 \pm 0.30$  in the group pretreated by thalidomide and  $1.85 \pm 0.20$  in the group pretreated by CBOP11.

### Biodistribution study

Tumor uptake was respectively  $4.5 \pm 0.6 \text{ \%ID/g}$  and  $2.7 \pm 1.1 \text{ \%ID/g}$  24 h and 72 h after injection of  $^{125}\text{I}$ -F6 without pretreatment by thalidomide and respectively  $8.7 \pm 1.3 \text{ \%ID/g}$  and  $2.9 \pm 0.7$  24 h and 72 h after injection of  $^{125}\text{I}$ -F6 with pretreatment by thalidomide. In the group injected with  $^{125}\text{I}$ -F6 alone, tumor/blood, liver and kidney were respectively  $1.3 \pm 0.3$ ,  $7.4 \pm 3.2$  and  $4.4 \pm 2.0$  at 24 h and respectively  $7.4 \pm 2.1$ ,  $36.9 \pm 7.5$  and  $24.7 \pm 4.4$  at 72h. In the group pretreated by thalidomide, tumor/blood, liver and kidney were respectively  $2.2 \pm 0.1$ ,  $11.9 \pm 0.9$  and  $7.5 \pm 1.1$  at 24 h and respectively  $10.3 \pm 1.7$ ,  $34.3 \pm 4.5$  and  $29.8 \pm 3.1$  at 72h.

### Histological study

Tumor proliferation was microscopically comparable in the different samples obtained from growing tumors, consisting of a dense growth of large cells with a high nucleocytoplasmic ratio. The large nuclei displayed regular borders, fine chromatin and small nucleoli. Proliferation took the form of rows and lobules separated by a thin fibrovascular stroma. Control tumor obtained from untreated mice was characterized by the presence of 5 to 20 % of necrosis. MIB-1 labeled 40 to 50% of nuclei, and 100% of the cells expressed CEA.

MIB-1 labeled 40 to 50% of nuclei, and 100% of the cells expressed CEA in all assessed treated tumors. After RIT, tumor necrosis was evaluated at 10% of tumor at day 15, 40-50% at day 30 and 20% at day 45 and day  $> 60$ . So, the maximal value was observed at day 30. The values were not higher than the control tumor at the other days. After CBOP11, maximal necrosis was observed at day 15 with 40% of tumor and decreased at day 30 (30%), day 45 (5%) and day  $> 60$  (Figure 7). After RIT/CBOP11 concomitant treatment, large necrosis was prolonged to day 45 (40%), suggesting a prolonged efficacy of the combined treatment. Direct impact on tumor development and spraying can explain better tumor control by antiangiogenic drugs prior RIT protocol. Vasculature was detected by clone on paraffin sections. As compared to untreated tumor, vasculature regression was estimated at 20% 15 days after treatment either by CBOP11 or RIT (Figure 8). Concomitant treatment induced a improved effect on vasculature regression, which was estimated at day 15 at 70%.



### DISCUSSION

Angiogenesis is a complex and coordinated process, requiring several signaling steps. VEGFs and their receptors are key molecules in the regulation of vessel growth [22]. Thalidomide is postulated to have antiangiogenic activity through its ability to interfere with the VEGF and basic fibroblast growth factor (bFGF) pathways [19, 23, 24]. Thalidomide induces a regulation of VEGF receptors mediated by ceramides and antagonized by sphingosine-1-phosphate [22]. CBOP11 encompasses residues 79-93 of VEGF which are involved in the interaction with VEGF receptor-2 [20]. CBOP11 inhibits VEGF binding to endothelial cells, endothelial cell proliferation, migration and signaling induced by VEGF. Present study established benefits of combination of RIT with antiangiogenic agents in MTC. The two antiangiogenic agents, thalidomide and CBOP11, sensitized tumors to RIT when drugs were administered before or in concomitance with RIT. Surprisingly, antiangiogenic therapy improved the effect of RIT on large tumors. Moreover, combination of RIT with antiangiogenic agents induced a prolonged biological response, with stabilization of Ct secretion whereas a recurrence of tumor growth was observed. Stronger impact on tumor vasculature may explain this observation. Tonami and coworkers reported benefits of association of RIT with antiangiogenic agents in human colon cancer xenografts [23-25]. Thalidomide associated with the iodine-131-labeled anti-glycoprotein MAb A7 produced more efficient tumor growth inhibition than did the mono-therapy [23]. Immunohistochemistry revealed a decrease in the microvessel number within tumors treated with thalidomide and that combined therapy further reduced the microvessel number. Moreover, in an animal model of liver metastases, this group assessed antiangiogenic therapy with 2-methoxyestradiol (2-ME) and RIT using the same MAb [25]. All non-treated mice died by 31 days following cell inoculation. Monotherapy comprising 2-ME treatment resulted in slightly better survival. RIT displayed a marked therapeutic effect. The combined regimen demonstrated superior survival in comparison to monotherapy. Another team assessed the cyclic Arg-Gly-Asp peptide Cilengitide (EMD 121974), which targets the  $\alpha(v)\beta(3)$  integrin receptor expressed on neovasculature, combined with systemic RIT in an aggressive human breast cancer model having mutant p53 and expressing bcl-2 [26]. Cilengitide combined with RIT significantly increased therapeutic efficacy and

expressing bcl-2 [26]. Cilengitide combined with RIT significantly increased therapeutic efficacy and apoptosis when compared with single-modality therapy. Neuroendocrine tumors are characterized by abundant vasculature and high levels of VEGF expression, and are therefore potentially susceptible to therapeutic strategies targeting angiogenic pathways [27]. Bevacizumab, a monoclonal antibody targeting VEGF, and SU11248, a small molecule tyrosine kinase inhibitor targeting the VEGF receptor, have both recently been shown to have single agent activity in neuroendocrine tumors [28, 29]. Moreover, thalidomide was associated with apparent disease stabilization in a small phase II study of patients with metastatic neuroendocrine tumors [30]. Angiogenesis plays probably an important prognostic role in MTC. Indeed, a pathology study assessing 53 MTC patients observed that the number of newly formed vessels was significantly associated with poor prognosis [31]. All patients who died of the disease showed a microvessel count higher than 30, which resulted in a high statistical difference compared with living patients ( $p = 0.00098$ ). Multiple logistic regression analysis showed that microvessel count together with pTNM ( $p = 0.026$ ) were statistically significant prognostic factors. Moreover, encouraging evidence of antitumor activity has been reported in patients with metastatic hereditary MTC using vandetanib, a multitargeted kinase inhibitor exhibiting potent activity against VEGF receptor-2 kinase insert domain-containing receptor [KDR] and, to a lesser extent, epidermal growth factor receptor (EGFR) and RET kinase [32]. Clinical application of combination of RIT and antiangiogenic therapy might be promising only if acceptable toxicity is observed. In addition to teratogenicity, thalidomide induces side effects including somnolence, constipation, skin rashes, orthostatic hypotension, nausea, neuropathy and neutropenia [33]. Clinical toxicity of CBOP11 is unknown but our results revealed CBOP11-induced leukopenia. Toxicity of RIT is essentially hematological too. No additional toxicity was observed in the association

## Résultats : autres publications

---

Cilengitide/RIT [26]. As reported by Kinuya et al., our study showed that the combined regimens delayed recovery of the leukocytes concentration as compared to RIT alone [25]. Interestingly, hematological toxicity was higher in the group showing an increased anti-tumor effect. Indeed, groups showing tumor efficacy were associated with leucopenia and increase of platelets. The combined therapy may target hematological stem cells such as endothelial progenitors, involved in hematopoiesis and tumor development. Platelet increase may repair vessel damage induced by antiangiogenic agents and ionizing radiation. As reported for combination of RIT and chemotherapy [34], the timing of association appeared determinant. Our study demonstrated no benefit of antiangiogenic therapy given after RIT. Burke et al. already showed a significant decrease of microvessel density after RIT compared with untreated mice [35]. The fact that RIT modulated tumor vasculature might explain why therapy with antiangiogenic agents before RIT was superior than after RIT. In our experiments, the biodistribution study showed that a pretreatment by thalidomide increased MAb tumor uptake, allowing increase tumor absorbed dose. As previously explained with external radiotherapy, antiangiogenic agents may probably normalize vascularisation, improve tumor perfusion, reduce hypoxia and increase radiosensitivity [36]. Moreover, VEGF and bFGF are cytokines known to optimize the survival of endothelial cells under stress exposure. By inhibiting these endothelial survival pathways, antiangiogenic agents could sensitize endothelial cells to radiation delivered by RIT, increase death of endothelial cell and reduce tumor growth [37].

### **CONCLUSION**

In conclusion, pretreatment with thalidomide and CBOP11 improved RIT efficacy in MTC, with acceptable toxicity. Antiangiogenic therapy restored effect of RIT on large tumors. Future investigations will be performed to understand how antiangiogenic agents enhance RIT efficacy.

### **Aknowledgements :**

The authors thank the ARC for financial support.

## Résultats : autres publications

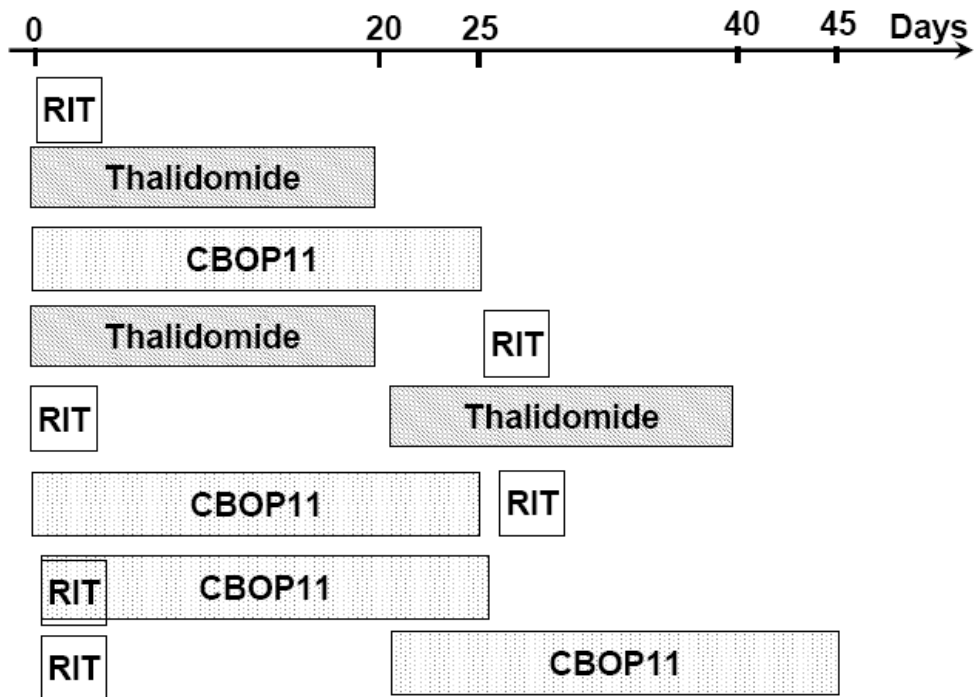


Figure 1. Description of treatment procedures. For radioimmunotherapy (RIT), an activity of 92.5 MBq (250 microgrammes) of  $^{131}\text{I}$ -F6 fragment was injected i.v. Thalidomide treatment consisted in administration of 200 mg/kg/day during 20 days by force-feeding and CBOP11 treatment in administration of 0.45 mg/kg/day during 25 days using a subcutaneous minipump. Combined therapies associated  $^{131}\text{I}$ -F6 at day 0 followed by thalidomide between day 20 and 40, thalidomide between day 0 and 20 followed by  $^{131}\text{I}$ -F6 RIT at day 25,  $^{131}\text{I}$ -F6 at day 0 and CBOP11 between day 0 and 25, CBOP11 between day 0 and 25 followed by  $^{131}\text{I}$ -F6 RIT at day 25 and finally  $^{131}\text{I}$ -F6 at day 0 followed by CBOP11 between day 20 and 45.

## Résultats : autres publications

---

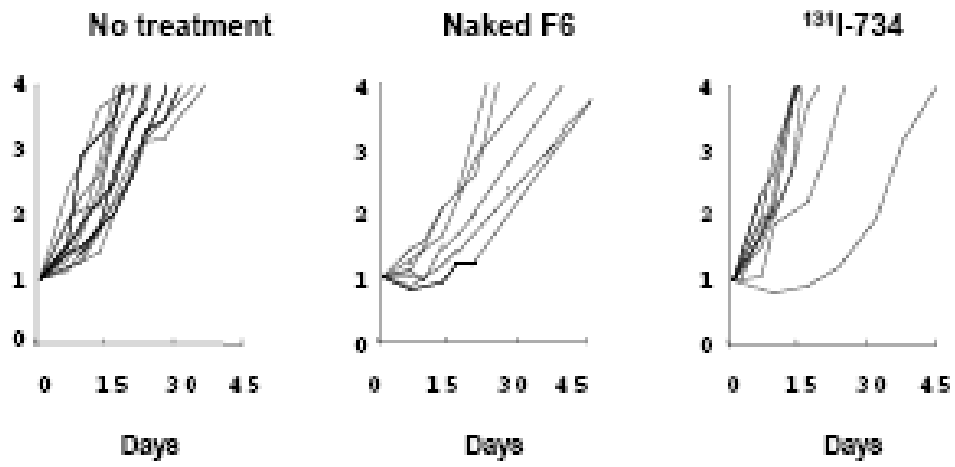
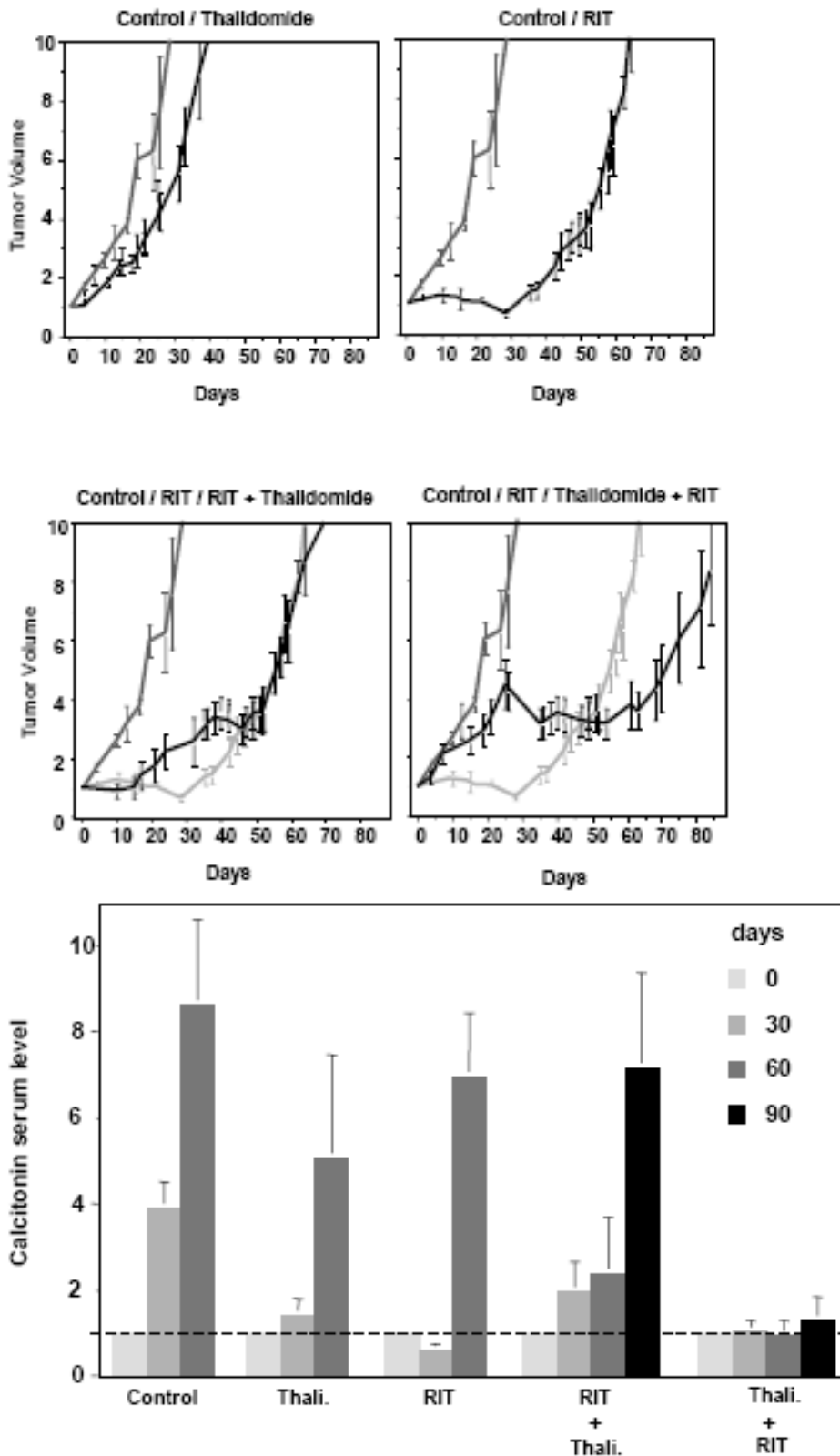


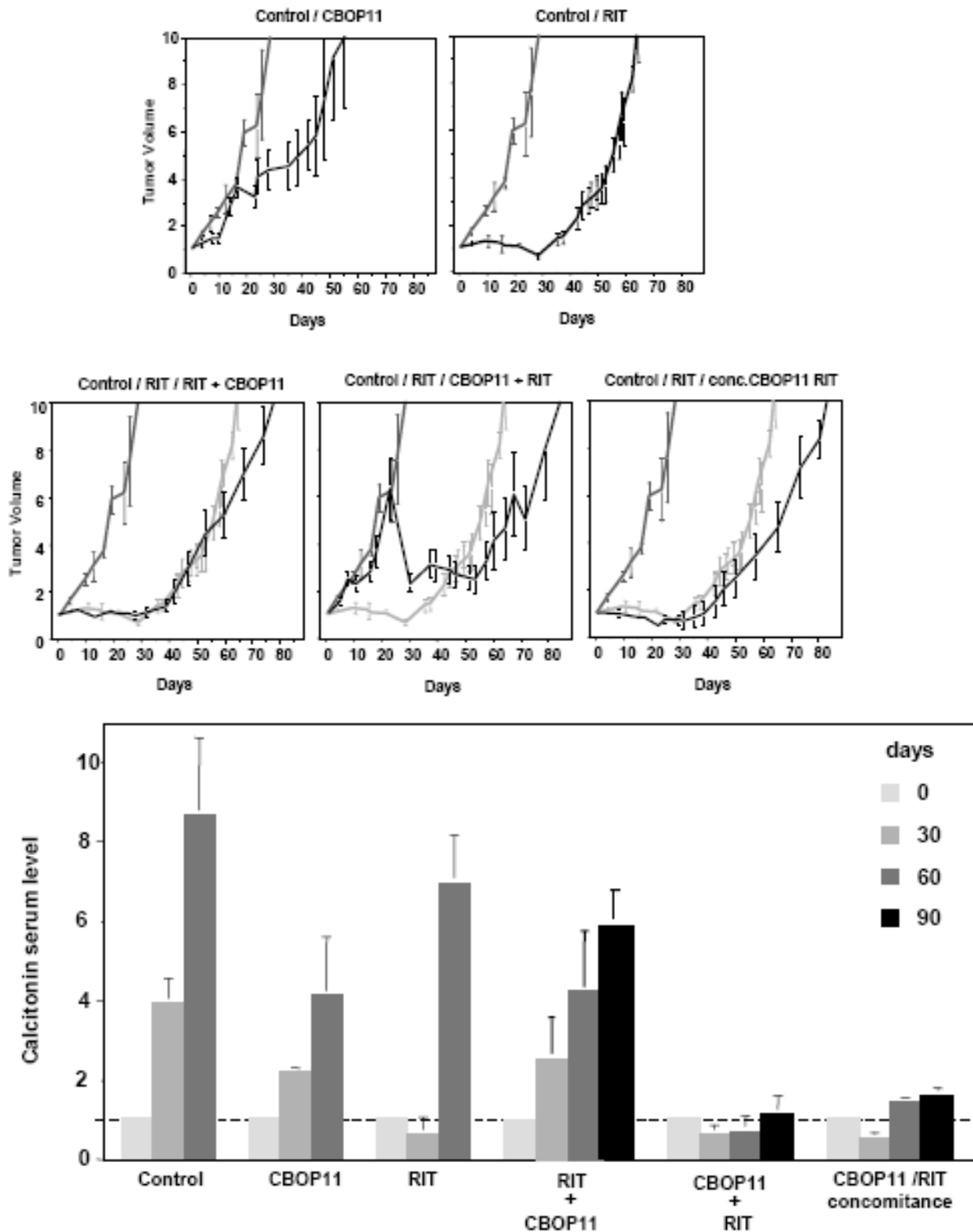
Figure 2. Tumor volume in control groups.

## Résultats : autres publications



**Figure 3. Efficacy of the combination of thalidomide and <sup>131</sup>I-F6 RIT.** (A) Changes in TT tumor volume in treated mice and controls. Graphs show relative tumor volume (ratio of tumor volume to initial size before treatment) as a function of time. (B) Changes in calcitonin concentration (pg/ml) in treated mice and controls. Graphs show the relative calcitonin concentration (ratio of calcitonin concentration to the initial concentration before treatment) as a function of time.

## Résultats : autres publications



**Figure 4. Efficacy of the combination of CBOP11 and 131I-F6 RIT.** (A) Changes in TT tumor size in treated mice and controls. Graphs show relative tumor volume (ratio of tumor volume to initial size before treatment) as a function of time. (B) Variation of calcitonin concentration (pg/ml) in treated mice and controls. Graphs show the relative calcitonin concentration (ratio of calcitonin concentration to the initial concentration before treatment) as a function of time.

## Résultats : autres publications

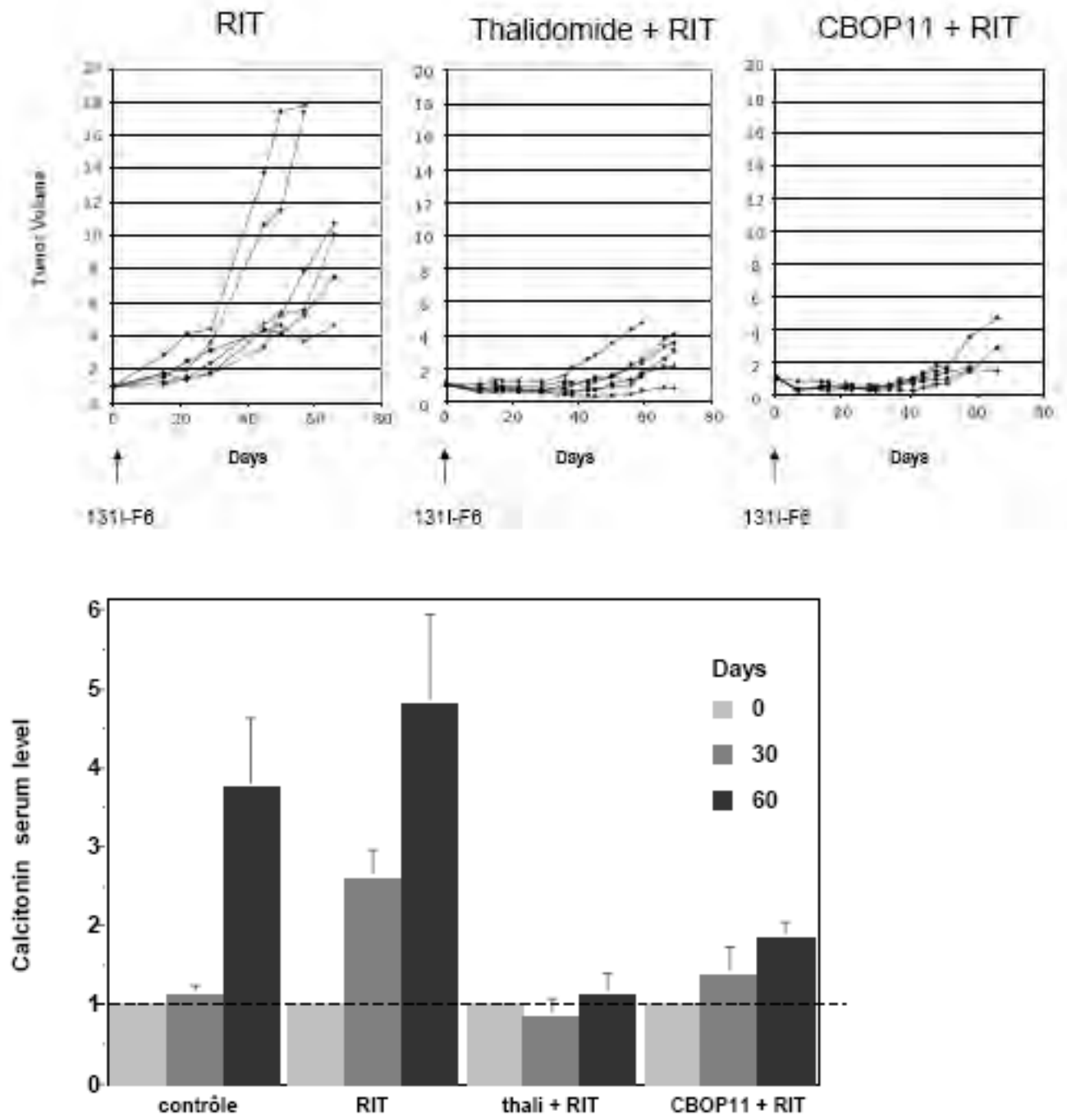
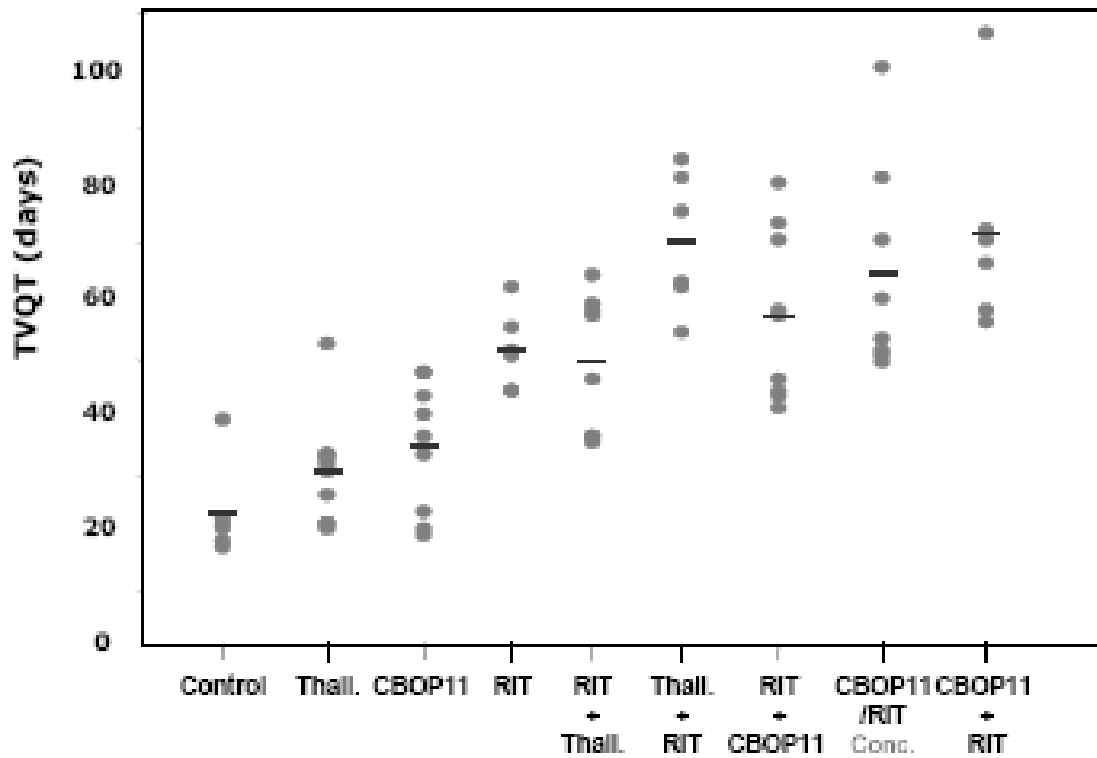
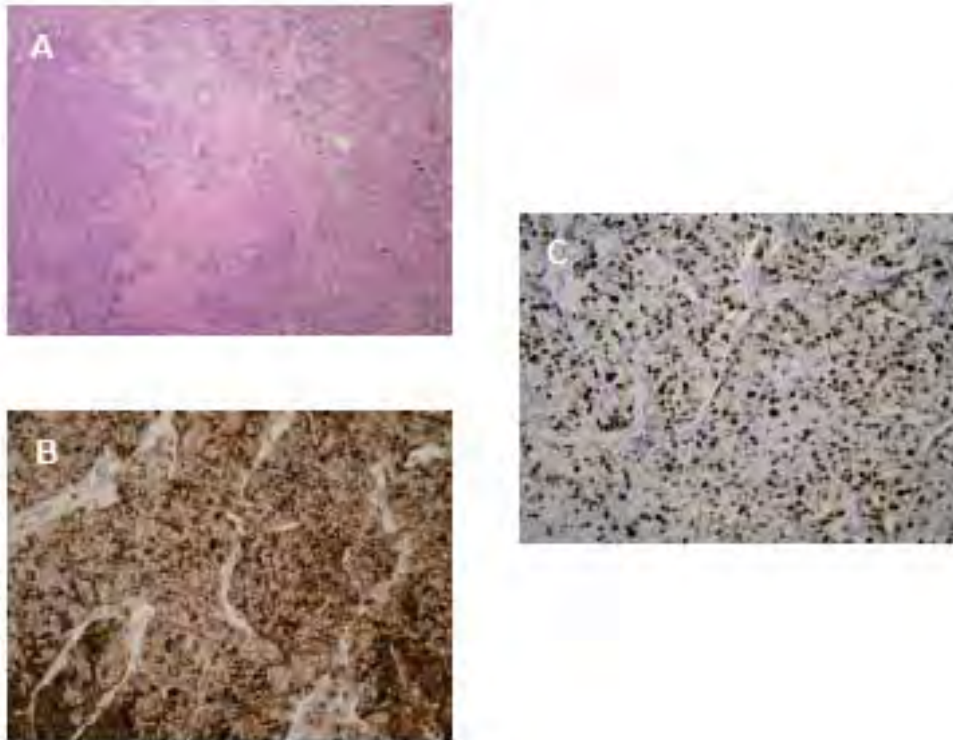


Figure 5. Tumor volume quadrupling time (TVQT) in non-treated control and treated groups.



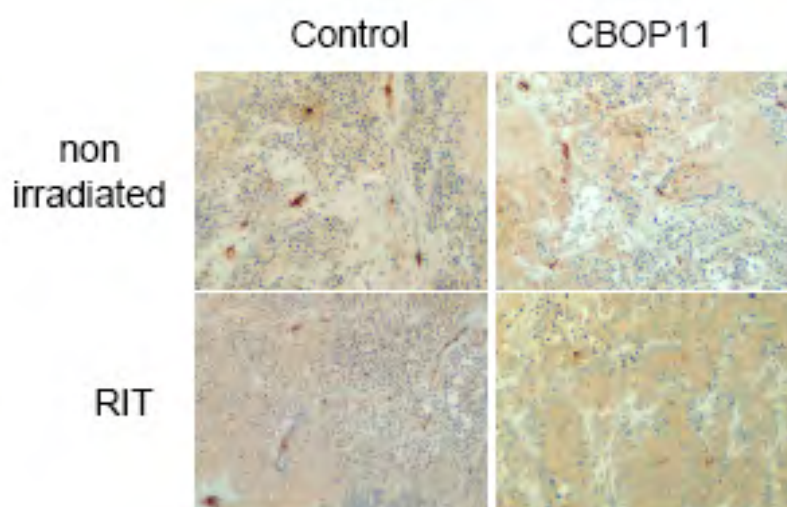
**Figure 6. Efficacy of the combination of antiangiogenic treatment and <sup>131</sup>I-F6 RIT on large tumors.** (A) Changes in TT tumor size in treated mice and controls. Graphs show relative tumor volume (ratio of tumor volume to initial size before treatment) as a function of time. (B) Changes in calcitonin concentration (pg/ml) in treated mice and controls. The day 0 represents the day of RIT administration. Graphs show the relative calcitonin concentration (ratio of calcitonin concentration to the initial concentration before treatment) as a function of time.





**Figure 7. Histological studies of TT xenograft treated by CBOP11.** (A) Hematoxylin-eosin staining showing large tumor necrosis (original magnification, x 100). (B) Immunohisto-chemistry using anti-CEA antibody. Strong CEA expression on both surface and cytoplasm (original magnification, x 200). (C) Hybridization with Ki67 antibody. 40-50% MIB-1 expression (original magnification, x 200).

## Résultats : autres publications



**Figure 8. VWF immunostaining of TT xenograft treated by CBOP11.** Hybridization with anti-van Willebrand factor polyclonal antibody showing the vasculature in function of treatment by RIT and/or CBOP11. (original magnification, x 200).

**TABLE 1**

Blood cell variations at different days (D) after treatment.

	D0	D15	D30	D45	D60
% leukocyte concentration as compared to D0					
<sup>131</sup> I-F6	100±0	41±21	87±23	139±32	124±27
Thalidomide	100±0	99±27	95±54	95±51	105±62
Thalidomide + <sup>131</sup> I-F6	100±0	71±60	ND	26±26	72±45
<sup>131</sup> I-F6 + Thalidomide	100±0	34±24	110±94	153±82	120±91
CBOP11	100±0	41±25	82±19	73±32	76±17
CBOP11 + <sup>131</sup> I-F6	100±0	ND	41±19	62±33	54±12
CBOP11 / <sup>131</sup> I-F6 concomitant	100±0	29±27	44±16	80±36	114±64
<sup>131</sup> I-F6 + CBOP11	100±0	43±22	68±37	100±47	154±77
% platelet concentration as compared to D0					
<sup>131</sup> I-F6	100±0	42±12	116±45	142±49	135±65
Thalidomide	100±0	96±48	83±22	101±33	77±39
Thalidomide + <sup>131</sup> I-F6	100±0	116±15	147±65	ND	114±34
<sup>131</sup> I-F6 + Thalidomide	100±0	50±14	89±27	73±12	108±58
CBOP11	100±0	71±20	75±7	80±16	85±17
CBOP11 + <sup>131</sup> I-F6	100±0	ND	192±146	112±52	110±11
CBOP11 / <sup>131</sup> I-F6 concomitant	100±0	ND	77±68	156±39	193±137
<sup>131</sup> I-F6 + CBOP11	100±0	60±15	86±17	80±15	79±17

ND: Not define

## Résultats : autres publications

---

---

### REFERENCES

1. Chatal JF. Radioimmunotherapy, a new breakthrough in the treatment of follicular non-Hodgkin's lymphoma: the European perspective. *Cancer Biother Radiopharm*. 2006;21:1-4.
2. Juweid M. Radioimmunotherapy of B-cell non-hodgkin's lymphoma : from clinical trials to clinical practice. *J Nucl Med*. 2002;43:1507-1529.
3. Goldenberg DM. Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies. *J Nucl Med*. 2002;5:693-713.
4. Goldenberg DM, Sharkey RM. Advances in cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2006;50:248-264
5. Goldenberg DM, Sharkey RM, Paganelli G, Barbet J, Chatal JF. Antibody pretargeting advances cancer radioimmunodetection and radioimmunotherapy. *J Clin Oncol*. 2006;24:823-834.
6. Barbet J, Kraeber-Bodéré F, Vuillez JP, Gautherot E, Rouvier E, Chatal JF. Pretargeting with the affinity enhancement system for radioimmunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm*. 1999;14:153-166.
7. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Eng J Med*. 1971;285:1182-1186.
8. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med*. 1995;1:27-31.
9. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991;324:1-8.
10. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol*. 1993;143: 401-409.
11. Heimann R, Ferguson D, Powers C, Recant WM, Weichselbaum RR, Hellman S. Angiogenesis as a predictor of long-term survival for patients with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88:1764-1769.
12. Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick R. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science*. 2003;300:1155-1159
13. Ishikawa N, Hamada S. Association of medullary carcinoma of the thyroid with carcinoembryonic antigen. *Br. J. Cancer*. 1976;34:111-115.

## Résultats : autres publications

---

14. Kraeber-Bodéré F, Faivre-Chauvet A, Sai-Maurel C, et al. Comparative toxicity and efficacy of one-and two-step (bipefic antibody and bivalent hapten) radioimmunotherapy in CEA-producing medullary thyroid cancer. *J Nucl Med*. 1999, 40: 198-204.
15. Kraeber-Bodéré F., Faivre-Chauvet, A., Sai-Maurel, C., et al. Toxicity and efficacy of radioimmunotherapy in CEA-producing medullary thyroid cancer xenograft: comparison of iodine-131-labeled F(ab')<sub>2</sub> and pretargeted bivalent hapten, and evaluation of repeated injections. *Clin. Cancer Res*. 1999;5:3183s-3189s.
16. Kraeber-Bodéré F, Bardet S, Hoefnagel CA, et al. Radioimmunotherapy in medullary thyroid cancer using bispecific antibody and iodine-131-labeled bivalent hapten: Preliminary results of a phase I/II clinical trial. *Clin Cancer Res*. 1999;5:3190s-3198s.
17. Chatal JF, Campion L, Kraeber-Bodere F, et al. Survival improvement in medullary thyroid carcinoma patients given pretargeted CEA radioimmunotherapy. *J Clin Oncol*. 2006;24:1705-1711
18. Kulke M, Stuart K, Enzinger PC, et al. Phase II Study of Temozolomide and Thalidomide in Patients With Metastatic Neuroendocrine Tumors. *J Clin Oncol*. 2006;24: 401-406
19. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, et al. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4082-4085.
20. Zilberberg L, Shinkaruk S, Lequin O, et al. Structure and inhibitory effects on angiogenesis and tumor development of a new vascular endothelial growth inhibitor. *J Biol Chem*. 2003;278:35564-35573.
21. Farker PJ, Speck JC. Protein and cell membrane iodination with a springly soluble chloramine; 1,3,4,6 tetrachloro-3a, 6a-diphenyl glycoluryl. *Biophys Res Commun*. 1978,80:849-854.
22. Yabu T, Tomimoto H, Taguchi Y, Yamaoka S, Igarashi Y, Okazaki T. Thalidomide-induced antiangiogenic action is mediated by ceramide through depletion of VEGF receptors, and is antagonized by sphingosine-1-phosphate. *Blood*. 2005;106:125-134.
23. Kinuya S, Kawashima A, Yokoyama K, et al. Cooperative effect of radioimmunotherapy and anti-angiogenic therapy with thalidomide in human cancer xenografts. *J Nucl Med*. 2002; 43:1084-1089
24. Li XF, Kinuya S, Yokoyama K, et al. Benefits of combined radioimmunotherapy and anti-angiogenic therapy in a liver metastasis model of human colon cancer cells. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2002;12:1669-1674.
25. Kinuya S, Yokoyama K, Koshida K, et al. Improved survival of mice bearing liver metastases of colon cancer cells treated with a combination of radioimmunotherapy and antiangiogenic therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004;31:981-985.

## Résultats : autres publications

---

26. Burke PA, DeNardo SJ, Miers LA, Lamborn KR, Matzku S, DeNardo GL. Cilengitide targeting of alpha(v)beta(3) integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts. *Cancer Res.* 2002;62:4263-4272.
27. Terris B, Scoazec JY, Rubbia L, et al: Expression of vascular endothelial growth factor in digestive neuroendocrine tumours. *Histopathology* 1998;32:133-138.
28. Kulke M, Lenz H, Meropol N, et al. A phase 2 study to evaluate the efficacy and safety of SU11248 in patients (pts) with unresectable neuroendocrine tumors (NETS). *J Clin Oncol.* 2005; 23(suppl):4008P.
29. Yao J, Ng C, Hoff P, et al: Improved progression free survival (PFS) and rapid, sustained decrease in tumor perfusion among patients with advanced carcinoid treated with bevacizumab. *J Clin Oncol.* 2005; 23(suppl):4007P.
30. Xu Y, Ellison C, Martin E, et al: A phase II study of thalidomide in metastatic neuroendocrine tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 2002;20(suppl):1931P.
31. Fontanini G, Vignati S, Pacini F, Pollina L, Basolo F. Microvessel count: an indicator of poor outcome in medullary thyroid carcinoma but not in other types of thyroid carcinoma. *Mod Pathol.* 1996;9:636-641.
32. Herbst RS, Heymach JV, O'Reilly MS, Onn A, Ryan AJ. Vandetanib (ZD6474): an orally available receptor tyrosine kinase inhibitor that selectively targets pathways critical for tumor growth and angiogenesis. *Expert Opin Investig Drugs.* 2007;16:239-249.
33. Calabrese L, Fleischer AB. Thalidomide: current and potential clinical applications. *Am J Med.* 2000;108:487-495.
34. DeNardo SJ, Kroger LA, Lamborn KR, et al. Importance of temporal relationships in combined modality radioimmunotherapy of breast carcinoma. *Cancer.*1997;80:2583-2590.
35. Burke PA, DeNardo SJ, Miers LA, Lamborn KR, Matzku S, DeNardo GL. Cilengitide targeting of alpha(v)beta(3) integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts. *Cancer Res.* 2002 ;62:4263-4272.
36. Winkler F, Kozin SV, Tong RT, Chae SS, Booth MF, Garkavtsev I, Xu L, Hicklin DJ, Fukumura D, di Tomaso E, Munn LL, Jain RK. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell.* 2004;6:553-563.
37. Wachsberger P, Burd R, Dicker AP. Tumor response to ionizing radiation combined with antiangiogenesis or vascular targeting agents: exploring mechanisms of interaction. *Clin Cancer Res.* 2003;9:1957-1971

## Résultats : autres publications

---

### 3) Signalisation émanant de la membrane plasmique suite à l'irradiation ionisante (Revue)

**Plasma membrane signaling induces by ionizing radiation.**

Isabelle Corre, Colin Niaudet and Francois Paris\*

Inserm UMR U892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, Institut de  
Recherche Thérapeutique, 8 Quai Moncoussu, F-44007 Nantes cedex 1, France

\* Corresponding author : Email : [fparis@nantes.inserm.fr](mailto:fparis@nantes.inserm.fr)

Tel +33 (0) 228 08 03 02 / Fax +33 (0)228 08 02 04.

### Abstract

If DNA has been considered in cells as the principal target of deleterious effects of ionizing radiation (IR), signals initiated at cellular membranes are now identified as critical events in a large spectrum of radiation-induced cellular processes. Difference between DNA damage and membranes signaling may be dependent of cell type and/or physiological status. If IR provokes DNA damage directly by energy deposit on the DNA double helix and indirectly by reactive oxygen species (ROS), origin of molecular events initiated by IR remains more obscure. Generation of ROS inducing proteins and lipids modifications seems to be the prevalent hypothesis. However, protein and/or lipids relocalization is now also considered as potential mechanisms of cell signaling generation. In the context of an oxydative stress such as IR, the best example being the translocation of the acid sphingomyelinase (Asmase) enzyme from lysosomes to the outer layer of cell membrane, which then facilitates sphingomyelin hydrolysis and ceramide formation. Ceramide coalescence with cholesterol forms lipids microdomains in the plasma membrane, enhancing clustering of signaling receptors (death receptors like FAS, TNF, CD40, TRAIL or G protein-coupled receptors). In this manuscript, we propose to overview the different key molecular mechanisms induced in the membrane after irradiation in perspective with their linked molecular actors.

**Keywords :** ionizing radiation /plasma membrane/signaling molecules/ceramide/reactive oxygen species

### Abbreviations :

IR: ionizing radiation -Asmase : Acid sphingomyelinase - S1P: sphingosine 1 phosphate - TNF : tumor necrosis factor -cav-1 : caveolin-1 -ROS : reactive oxygen species- ER : endoplasmic reticulum.

## 1- Introduction

For the past 50 years, radiobiology studied the biological fate of cells or tissues exposed to ionizing radiation. Because of its crucial key role to preserve cell integrity, DNA double helix in the nucleus was pointed as the primary and major relevant target of IR either by direct energy deposit or indirectly through reactive oxygen species generation. Use of microbeam system allowing a selective irradiation of either the nucleus or the cytoplasm demonstrated that an onset of cell signaling can originate from other organelles than the nucleus. Glioma cells precisely traversed through cytoplasm with one  $^3\text{He}^{2+}$  ion could generate nitric oxide, leading to micronuclei formation [1]. Moreover, IR acted directly on free-nucleus membrane preparation, generating ceramide sphingolipid proven that plasma membrane represents an alternative target to DNA in radiation-induced cell response [2]. In this present manuscript, we proposed to specifically review principal physical and molecular early events, induced especially on the cell membrane, which could modify the cell fate after radiation.

## 2- Effect of ionizing radiation on plasma membrane structure and organisation

### 2.1. Modification of membrane constituents

#### 2.1.1 Lipids / Proteins oxidation

Membranes have been considered as an inactive semipermeable lipid bilayers consisting of amphipathic phospholipids, sterol and proteins allowing the segregation of molecules in different cell compartments. Capacity of phospholipids and proteins to diffuse and to rotate into the membrane allows the formation of proteins and lipids complexes enhancing cellular responses [3]. Irradiation of erythrocyte ghosts up to 40 Gy measured by spin labelled fatty acid ester, showed a dose dependent decreased of order [4], but mitigated by inclusion of membrane structure-modulating agents (e.g., cholesterol) and antioxidants



(e.g., tocopherol, eugenol) [5]. Fluidity was specifically increased in the lipophilic phase, but decreased in the lipid-protein interface [6].

Plasma membrane fluidity and permeability are directly affected by radiation-induced lipid damage. Lipid peroxidation and fragmentation represents the principal lipid modifications observed after exposure to ionizing radiation. Lipid fragmentation appears in both hydrophilic and hydrophobic sections of lipids [7]. Lipid peroxidation increase in the first hours after radiation exposure is a process of lipid degradation, mostly affecting polyunsaturated fatty acids, leading to fragmentation of their polar component [8].

### 2.1.2 Sphingolipid metabolism

Ceramide is considered as the backbone of all sphingolipids. Ceramide is generated from the hydrolysis of sphingomyelin, one of the four sphingolipids found in plasma membranes essentially located in the external leaflet. Ceramide and other sphingolipid components (sphingosine, sphingosine-1-phosphate [S1P], gangliosides) have numerous biological functions, such as regulating signal transduction pathways or directing protein sorting [9]. Irradiation induced a rapid and transitory generation of ceramide induced by the hydrolysis of sphingomyelin through the membrane-bound neutral sphingomyelinases or by the acid sphingomyelinase which relocates under stimulation from the lysosomal compartment to the external leaflet of the cell membrane in a variety of primary lymphoblast [10] and endothelial cell [2] and tumor cells, such as Burkitt's lymphoma [11], prostate tumor [12]. Generation of ceramide after IR was combined with a decrease of the pool of sphingomyelin in the plasma membrane [2], affecting then also the structural properties of the plasma membrane. Beside ceramide generation, ionizing radiation has also been shown as affecting others membrane sphingolipids. Sphingosine was increased in LNCaP cells as soon as 30 minutes after exposure to 8 Gy [13]. If direct radio-modulation pro-survival factor S1P has not

been shown, the fact that IR and oxidative stress downregulated respectively sphingosine kinase, enzyme allowing the sphingosine phosphorylation, and sphingosine-1-phosphate [14] strongly argues towards the capacity of radiation to control the S1P intracellular pool.

### 2.2. Modification of sphingolipids microdistribution into the plasma membrane

The classical fluid mosaic model of the cell membrane from Singer and Nicolson [15] has been revisited and now include biophysical findings on the spontaneous organisation of lipids into discrete microdomains [16]. Biological membranes typically contain sphingolipids, with sphingomyelin being the most abundant component of this fraction, cholesterol and others glycerophospholipids. Sphingomyelin is composed of a high hydrophobic ceramide moiety and an hydrophilic phosphorylcholine headgroup. Sphingolipids interact with each other by their hydrophilic part and cholesterol associate tightly to sphingolipids via hydrogen bonds and Van der Waals interactions between the sterol ring and the ceramide moiety. These tight interactions promote the lateral association of sphingolipids and cholesterol and results in the separation of sphingolipids- and cholesterol-enriched domains, also called membranes rafts, from the other phospholipids [17]. These small tightly packed domains exist in a more ordered liquid phase than the other parts of the cell membrane. Further stabilisation of these rafts microdomains is also provided by cholesterol filling the voids between the large bulky glycerosphingolipides [17]. It is well established that under IR and ROS stress, membrane sphingomyelin is hydrolysed by the enzyme acid sphingomyelinase, resulting in *in situ* generation of ceramide [10]. The release of ceramide within rafts deeply alters the biophysical properties of these membranes domains. *In vitro* studies on artificial lipid bilayers [18,19] demonstrated that ceramide molecules have the unique property of spontaneously associate and fuse membranes, consequently driving the coalescence of ceramide-enriched rafts microdomains to form large, ceramide-enriched membrane platforms, excluding cholesterol.

On behalf of these biophysical data issued from membranes models, different studies clearly identified in living cells formation of these ceramide-enriched large platforms in response to different stimuli (Fas Ligand, CD40...), triggering ceramide generation by activation of Asmase [20,21,22]. Ceramide generation in the plasma membrane was first described as essential in endothelial cell to initiate IR-induced apoptosis [2]. Importance of ceramide induced-coalescence of membrane microdomains, and consequently formation of ceramide-enriched large platforms, has recently been described by confocal microscopy analysis in human radiosensitive carcinoma cells [23] illustrating the importance of these domains in the cell response to IR as defect in their formation was correlated to radioresistance .

### 2.3 Modification of sub-membrane organisation: focus on actin cytoskeleton.

Beside its complex lateral organisation as a lipid bilayer, the plasma membrane is also linked to the actin cytoskeleton by interaction of lipid or protein effectors aimed at tethering actin filaments on its inner face. Cell cytoskeleton plays a major role in the cell by maintaining the cell shape integrity. IR has been clearly identified as modulators of cell cytoskeleton organisation [24,25,26]. *In vitro* studies have highlighted different effects of IR on actin network depending on cell type but also on the delivered dose. In microvascular endothelial cells of pulmonary origin observed 24 hours after IR (6 to 30 Gy), a disorganisation of cytoskeleton with alteration in actin filaments was observed [24,26], whereas in microvascular cells isolated from the derm, a dose of 20 Gy induces a rapid and persistent increase in formation of stress fibers [25]. Low doses of IR in thyroid cells and in HT29 colon adenocarcinoma cells decrease content of polymerized F-actin leading to destruction of actin filaments [27,28].

### 3-Role of ionizing radiation in signaling pathways initiated at the plasma membrane.

#### 3.1 Lipid platforms induced cell signaling

##### 3.1.1. Membrane receptors activation in large lipid rafts

Only few studies demonstrated that ionizing radiation induced membrane reorganisation into cholesterol-enriched microdomains. Studies from Bionda et al. clearly showed that radiosensitivity of squamous carcinoma cell lines is dependant of their capacity to coalesce microdomains into large platforms after exposure to ionizing radiation [23]. Lipid platforms were preceded by Asmase activation and ceramide formation and were abolished by ROS scavengers. Other stresses inducing free radicals and/or ceramide generation, such as UV [29], cisplatine [30], S. Aureus [31], CD95 [22], have been shown to induce lipid microdomains coalescence. Microdomains and large platforms formation appear as a tool for the cell to sort proteins and to spatially re-organize receptors and intracellular signalling molecules. Death receptors (Trail, CD95, TNF) or Toll-like receptors (TLR2, 4, 5) or cytokines receptors (Il-1R) and growth factors (EGFR) are able to cluster into these ceramide-enriched platforms, leading then to a very high density of receptors in a small area of the membrane, a prerequisite phenomenon for an effective transmission of cell signalling into the cell [32]. Aggregation and trapping of receptors in ceramide-enriched domains can also limit lateral diffusion and thus stabilizes interaction of receptors with their ligands. Furthermore, key signalling molecules may be localized in raft domains. For example, DNA-PK, an enzyme involved in the DNA repair machinery and typically found in the nucleus, is found localized in lipids microdomains under IR [33], suggesting a role for this enzyme in signalling pathways initiate at the plasma membrane. Better characterization of the proteins included in the ceramide-enriched domains is still necessary to better understand early molecular events induced in the plasma membrane after radiation stress.

### 3.1.2 Stabilisation of protein complexes in caveolae

Caveolae represent a specialized special type of lipid rafts, forming small invaginations of plasma membrane enriched in cholesterol and sphingomyelin and stabilized by caveolin integral transmembrane proteins [34]. Role of caveolin in radiation response is controversial and may differ in function of cell type or potential involvement of ceramide generation after IR. Interaction between Caveolin-1 (Cav-1) with beta1 integrin and focal adhesion kinase (FAK) enhances cell adhesion and radioresistance by enhancing phosphorylation of AKT and GSK-3beta prosurvival pathways [35]. Deficiency in Cav-1 sensitizes pancreatic tumors [35] and intestinal crypt cells [36] to exposure to IR by repressing PI3K/AKT survival pathway. However, in an other hand, ceramide inhibited AKT phosphorylation and activation [37], by recruiting protein kinase Czeta in the caveolin-enriched microdomains [38]. Invalidation of cav-1 in adipocytes in fibroblast confers a gain of resistance to ceramide by decoupling respectively protein kinase Czeta and cav-1 to PI3K/AKT complexes [38,39]. Asnase was found to colocalized with cav-1 and PI3K. Finally, *asnase*<sup>-/-</sup> fibroblasts did not exhibit cav-1 association with PI(3)K receptor complexes proving that recruitment of caveolin 1 to PI3K complexes after exposure to IR is dependent on acid sphingomyelinase localisation [39].

### 3.1.3. Redox platforms

As mentioned above, lipids platforms participate in the signaling of apoptosis associated with oxydative stress such as IR. Another important role attributed to these lipids rafts is the regulation of redox signaling. Various cytokines, growth or death factors have been reported to generate reactive oxygen species ROS, which can then act as real second messengers to mediate different essential cellular functions. In non phagocytic cells, and particularly in endothelial cells, it has been shown that production of superoxide  $O_2^{\cdot -}$ , mainly

by the NADPH oxidase system, was dependent on lipids rafts platforms. Under different stimuli like Fas, endostatin or TNF on coronary arterial endothelial cells, membrane-bound NADPH oxydase catalytic subunit gp91 phox accumulates in LR and regulatory subunits (p47 phox and Rac proteins), translocate from the cytosol to these rafts domains, leading to fully activation of the enzyme [40]. Recent work from Jin et al. [41] gave insights that invalidation of Asmase and subsequently disruption of ceramide enriched rafts formation interferes with the redox signaling. Beside their direct effect on generation of radical species, IR have also been described as inducers of NADPH oxydase activation [42,43], but mechanisms of this activation remains elusive. One might speculate that ceramide enriched rafts generated by IR-induced activation of Asmase would be the missing link between IR and NADPH oxidase/ $O_2^{\cdot -}$  pathway.

### 3.2. Plasma membrane-linked signaling molecules and second messengers.

#### 3.2.1. Ceramide

As described in section 2.1, ionizing radiation induce in the plasma membrane the generation of the sphingolipide ceramide. Second messenger are molecules rapidly and transiently produced after cell stimulation, whose main function is to activate divers intracellular signaling molecules, thus allowing transmission of extracellular signals into the cell. Ceramide, especially in regard to apoptotic signaling might be considered as a second messenger, despite not being as well-characterized as the classical lipid second messenger like diacylglycerol (DAG) and phosphoinositides (PIP2/PIP3). Beside its implication in reorganizing organisation of the outer leaflet of the plasma membrane (discussed above), ceramide has been described as capable, despite slowly, of flipping to the inner side of the lipid bilayer [44,45], then potentially able to interact with intracellular molecules. Studies aiming at characterizing such potential intracellular targets of ceramide lead to the

identification of two ceramide-activated serine/threonine phosphatases (CAPP), namely PP2A and PP1 [46], whose phosphatase activity increased by specific binding to ceramide [47]. Once activated, these phosphatases act on different signaling proteins: retinoblastoma gene product Rb, Bcl-2, Akt, c-Jun, protein kinase C alpha (PKC $\alpha$ ). Ceramide has been described as an activator of the kinase suppressor of Ras protein KSR [48,49], which in turn is able to complex and phosphorylate the protein Raf-1 [49]. Very recent work from Kolesnick's team, identified a specific ceramide-binding domain in KSR, required for the kinase translocation to the membrane [50]. Another well characterized direct target of ceramide is PKC zeta  $\zeta$  as several groups have shown in vitro that natural long-acyl chain ceramide directly binds and activates PKC  $\zeta$  [51,52,53]. Signaling events downstream PKC activation involved diverse intracellular molecules (JunKinase JNK, PI3K/Akt, NFkappaB ...) and might be even contrasting depending on the cell system and will not be discussed here (for review, refer to [54]). Despite not being associated to ceramide localized at the plasma membrane, activation of the aspartic protease cathepsin D by ceramide has been described in the endo/lysosomal compartment and linked to the mitochondrial apoptotic pathway via activation of the protein Bid [55]. Recent studies identify plasma membrane ions channels as novel targets of ceramide, as in lymphoid T cells, ceramide inhibits two types of channels, namely the storage-operated Ca<sup>2+</sup> channel implied in calcium influx [56,57] and voltage-gated Kv1.3 K<sup>+</sup> channels [58] leading to potassium efflux. Altogether, these studies highlight the complexity of action of the sphingolipid ceramide as it can act both on plasma membrane structure and directly on intracellular signaling molecules.

### 3.2.2 Calcium

Cytoplasmic calcium Ca<sup>2+</sup> is one of the essential second messengers for multiple intracellular processes. Elevation of cytosolic Ca<sup>2+</sup> involves at least two different mechanisms:

entry from extracellular fluid and release from  $\text{Ca}^{2+}$ -storing organelles such as endoplasmic reticulum (ER).  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores involved inositol triphosphate receptors IP3R and ryanodine receptors.  $\text{Ca}^{2+}$  influx through plasma membrane relies on voltage- or storage-operated channels. Several studies reported regulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  by IR in different cell types [59,60]. These radiations-induced changes in  $\text{Ca}^{2+}$  can be elevations, oscillations or single transient changes within minutes to days after irradiation, strongly suggesting different mechanisms of IR-induced regulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . As we mention above, ceramide can regulate influx of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  at plasma membrane channel level [56,60]. Activation of PLC, the main enzyme activated at the plasma membrane which produces IP3 and consequently induces  $\text{Ca}^{2+}$  release from ER, has also been described in IR-treated carcinoma cell [61]. Calcium elevation in the cytosol leads to activation of different downstream pathways mainly by binding specific domains in signaling proteins. Such  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins like protein kinase C PKC [62,63] and  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin kinase [64] have been shown to be activated and to mediate signals after exposure to IR.

### 3.2.3 Rho GTPases

As we discussed in 2.3, IR regulate actin cytoskeleton reorganisation. Organisation of actin structures mainly depends on the activation of specialized proteins namely the Rho family small GTPases RhoA, Rac and Cdc42. Activation of the protein RhoA in response to IR has been described in endothelial and in glioblastoma cells leading then to increase in vascular permeability [25] or to enhanced invasion potential of tumor cells [65]. No direct irradiation-induced activation of Rac has been demonstrated yet and mechanisms of RhoA activation remain to be elucidated. One can hypothesize involvement of ROS and/or ceramide in activation of GTPases. In fact, several studies performed in vitro with exogenous ceramide (short chain or natural long chain) identified this sphingolipid as activator of RhoA [66] and



Rac [67]. Furthermore, activated small GTPases are found in lipids rafts domain [68]. Downstream molecular signaling pathways activated by small GTPases in response to IR are not well described, except for the RhoA/ROCK pathway implicated in fibrogenic differentiation of mesenchymal cells [69].

#### 4- Conclusion and perspectives

The comprehensive concept of the molecular events induced in plasma membrane begins to be defined. Radiolysis induced-ROS species may explain most of the molecular cascade activated into the membrane, through initiation of a physical membrane reorganisation modifying protein-protein and protein-lipid interactions. Because of their structural property in plasma membrane, cholesterol and sphingolipids represent two key actors of the membrane stress response. Moreover, ceramide generation after IR allows a quick and efficient fire starter to provoke the remodelling of the membrane. However, it still exists a great deal concerning mechanisms downstream to the raft formation. Knowledge of the proteins included in or excluded from the lipid microdomains will help to better define molecular pathways and related-cellular functions. Improved understanding of membrane mechanisms should lead to the development of new pharmacological approaches targeting membrane signaling molecules and mitigating cell response to radiation.

#### Acknowledgement

The authors would like to thank MH. Gaugler for helpful discussions and critical reading of the manuscript

### References

- [1] C Shao, M Folkard, BD Michael, KM Prise. Targeted cytoplasmic irradiation induces bystander responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 (2004) 13495-500.
- [2] A. Haimovitz-Friedman, C.C. Kan, D. Ehleiter, R.S. Persaud, M. McLoughlin, Z. Fuks and R.N. Kolesnick Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis, *J Exp Med* 180 (1994) 525-535.
- [3] A Catalá. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids.* 157 (2009) 1-11. Review.
- [4] E Grzelińska, G Bartosz, K Gwoździński, W Leyko. A spin-label study of the effect of gamma radiation on erythrocyte membrane. Influence of lipid peroxidation on membrane structure. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 36 (1979) 325-34.
- [5] KP Mishra. Cell membrane oxidative damage induced by gamma-radiation and apoptotic sensitivity. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 23 (2004) 61-6.
- [6] M Benderitter, L Vincent-Genod, A Berroud, S Muller, M Donner, P Voisin. Radio-induced structural membrane modifications: a potential bioindicator of ionizing radiation exposure? *Int J Radiat Biol.* 75 (1999) 1043-53.
- [7] OI Shadyro, IL Yurkova, MA Kisel. Radiation-induced peroxidation and fragmentation of lipids in a model membrane. *Int J Radiat Biol.* 78 (2002) 211-7.
- [8] IP Edimecheva, MA Kisel, OI Shadyro, AP Vlasov, IL Yurkova. The damage to phospholipids caused by free radical attack on glycerol and sphingosine backbone. *Int J Radiat Biol.* 71 (1997) 555-60.
- [9] N Bartke, YA Hannun. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res.* 50 (2009) S91-6. Review.
- [10] P. Santana, L.A. Pena, A. Haimovitz-Friedman, S. Martin, D. Green, M. McLoughlin, C. Cordon-Cardo, E.H. Schuchman, Z. Fuks and R. Kolesnick Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis, *Cell* 86 (1996) 189-199.
- [11] JM Michael, MF Lavin, DJ Watters. Resistance to radiation-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma cells is associated with defective ceramide signaling. *Cancer Res.* 57 (1997) 3600-5.
- [12] K Kimura, M Markowski, LC Edsall, S Spiegel, EP Gelmann. Role of ceramide in mediating apoptosis of irradiated LNCaP prostate cancer cells. *Cell Death Differ.* 10 (2003) 240-8.
- [13] VE Nava, O Cu villier, LC Edsall, K Kimura, S Milstien, EP Gelmann, S Spiegel. Sphingosine enhances apoptosis of radiation-resistant prostate cancer cells. *Cancer Res.* 60 (2000) 4468-74.
- [14] D Shida, K Takabe, D Kapitonov, S Milstien, S Spiegel. Targeting SphK1 as a new strategy against cancer. *Curr Drug Targets.* 9 (2008) 662-73. Review.
- [15] S.J. Singer and G.L. Nicolson The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science* 175 (1972) 720-731.
- [16] L.J. Pike Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function, *J Lipid Res* 47 (2006) 1597-1598.
- [17] K. Simons and E. Ikonen Functional rafts in cell membranes, *Nature* 387 (1997) 569-572.
- [18] J.M. Holopainen, M. Subramanian and P.K. Kimmunen Sphingomyelinase induces lipid microdomain formation in a fluid phosphatidylcholine/sphingomyelin membrane, *Biochemistry* 37 (1998) 17562-17570.

- [19] T.A. Nurminen, J.M. Holopainen, H. Zhao and P.K. Kinnunen Observation of topical catalysis by sphingomyelinase coupled to microspheres, *J Am Chem Soc* 124 (2002) 12129-12134.
- [20] A. Cremesti, F. Paris, H. Grassme, N. Holler, J. Tschopp, Z. Fuks, E. Gulbins and R. Kolesnick Ceramide enables fas to cap and kill, *J Biol Chem* 276 (2001) 23954-23961.
- [21] H. Grassme, A. Cremesti, R. Kolesnick and E. Gulbins Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation, *Oncogene* 22 (2003) 5457-5470.
- [22] H. Grassme, A. Jekle, A. Riehle, H. Schwarz, J. Berger, K. Sandhoff, R. Kolesnick and E. Gulbins CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts, *J Biol Chem* 276 (2001) 20589-20596.
- [23] C. Bionda, E. Hadchity, G. Alphonse, O. Chapet, R. Rousson, C. Rodriguez-Lafrasse and D. Ardail Radioresistance of human carcinoma cells is correlated to a defect in raft membrane clustering, *Free Radic Biol Med* 43 (2007) 681-694.
- [24] M. Friedman, U.S. Ryan, W.C. Davenport, E.L. Chaney, D.L. Strickland and L. Kwok Reversible alterations in cultured pulmonary artery endothelial cell monolayer morphology and albumin permeability induced by ionizing radiation, *J Cell Physiol* 129 (1986) 237-249.
- [25] D. Gabrys, O. Greco, G. Patel, K.M. Prise, G.M. Tozer and C. Kanthou Radiation effects on the cytoskeleton of endothelial cells and endothelial monolayer permeability, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 69 (2007) 1553-1562.
- [26] J.M. Onoda, S.S. Kantak and C.A. Diglio Radiation induced endothelial cell retraction in vitro: correlation with acute pulmonary edema, *Pathol Oncol Res* 5 (1999) 49-55.
- [27] L.M. Green, Z. Patel, D.K. Murray, S. Rightnar, C.G. Burell, D.S. Gridley and G.A. Nelson Cytoskeletal and functional changes in bioreactor assembled thyroid tissue organoids exposed to gamma radiation, *J Radiat Res (Tokyo)* 43 Suppl (2002) S213-218.
- [28] Z. Somosy, M. Sass, G. Bogner, J. Kovacs and G.J. Koteles X-irradiation-induced disorganization of cytoskeletal filaments and cell contacts in HT29 cells, *Scanning Microsc* 9 (1995) 763-770.
- [29] JA Rotolo, J Zhang, M Donepudi, H Lee, Z Fuks, R Kolesnick. Caspase-dependent and -independent activation of acid sphingomyelinase signaling. *J Biol Chem.* 280 (2005) 26425-34.
- [30] S Lacour, A Hammann, S Graziade, D Lagadic-Gossmann, A Athias, O Sergeant, G Laurent, P Gambert, E Solary, Dimanche-Boitrel MT. Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res.* 64 (2004) 3593-8.
- [31] H Grassmé, A Riehle, B Wilker, E Gulbins. Rhinoviruses infect human epithelial cells via ceramide-enriched membrane platforms. *J Biol Chem.* (280) 2005 26256-62.
- [32] CR Bollinger, V Teichgräber, E Gulbins. Ceramide-enriched membrane domains. *Biochim Biophys Acta.* (1746) 2005 284-94. Review.
- [33] H Lucero, D Gae, GE Taccioli. Novel localization of the DNA-PK complex in lipid rafts: a putative role in the signal transduction pathway of the ionizing radiation response. *J Biol Chem.* 278 (2003) 22136-43.
- [34] Lajoie P, Goetz JG, Dennis JW, Nabi IR. Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *J Cell Biol.* 185 (2009) 381-5. Review.
- [35] N Cordes, S Frick, TB Brunner, C Pilarsky, R Grützmann, B Sipos, G Klöppel, WG McKenna, EJ Bernhard. Human pancreatic tumor cells are sensitized to ionizing radiation by knockdown of caveolin-1. *Oncogene.* (26) 2007 6851-62.

## Résultats : autres publications

---

- [36] Li J, Hassan GS, Williams TM, Minetti C, Pestell RG, Tanowitz HB, Frank PG, Sotgia F, Lisanti MP. Loss of caveolin-1 causes the hyper-proliferation of intestinal crypt stem cells, with increased sensitivity to whole body gamma-radiation. *Cell Cycle*. (4) 2005 1817-25.
- [37] W Zundel, A Giaccia. Inhibition of the anti-apoptotic PI(3)K/Akt/Bad pathway by stress. *Genes Dev*. 12 (1998) 1941-6.
- [38] E Hajduch, S Turban, X Le Liepvre, S Le Lay, C Lipina, N Dimopoulos, I Dugail, HS Hundal. Targeting of PKCzeta and PKB to caveolin-enriched microdomains represents a crucial step underpinning the disruption in PKB-directed signalling by ceramide. *Biochem J*. 410 (2008) 369-79.
- [39] Zundel W, Swiersz LM, Giaccia A. Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol*. 20 (2000) 1507-14.
- [40] A.Y. Zhang, F. Yi, G. Zhang, E. Gulbins and P.L. Li Lipid raft clustering and redox signaling platform formation in coronary arterial endothelial cells, *Hypertension* 47 (2006) 74-80.
- [41] S. Jin, Y. Zhang, F. Yi and P.L. Li Critical role of lipid raft redox signaling platforms in endostatin-induced coronary endothelial dysfunction, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28 (2008) 485-490.
- [42] J.R. Collins-Underwood, W. Zhao, J.G. Sharpe and M.E. Robbins NADPH oxidase mediates radiation-induced oxidative stress in rat brain microvascular endothelial cells, *Free Radic Biol Med* 45 (2008) 929-938.
- [43] Y. Tateishi, E. Sasabe, E. Ueta and T. Yamamoto Ionizing irradiation induces apoptotic damage of salivary gland acinar cells via NADPH oxidase 1-dependent superoxide generation, *Biochem Biophys Res Commun* 366 (2008) 301-307.
- [44] F.X. Contreras, G. Basanez, A. Alonso, A. Herrmann and F.M. Goni Asymmetric addition of ceramides but not dihydroceramides promotes transbilayer (flip-flop) lipid motion in membranes, *Biophys J* 88 (2005) 348-359.
- [45] I Lopez-Montero, N. Rodriguez, S. Cribier, A. Pohl, M. Velez and P.F. Devaux Rapid transbilayer movement of ceramides in phospholipid vesicles and in human erythrocytes, *J Biol Chem* 280 (2005) 25811-25819.
- [46] C.E. Chalfant, K. Kishikawa, M.C. Mumby, C. Kamibayashi, A. Bielawska and Y.A. Hannun Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid, *J Biol Chem* 274 (1999) 20313-20317.
- [47] C.E. Chalfant, Z. Szulc, P. Roddy, A. Bielawska and Y.A. Hannun The structural requirements for ceramide activation of serine-threonine protein phosphatases, *J Lipid Res* 45 (2004) 496-506.
- [48] F. Yan, S.K. John and D.B. Polk Kinase suppressor of Ras determines survival of intestinal epithelial cells exposed to tumor necrosis factor, *Cancer Res* 61 (2001) 8668-8675.
- [49] Y. Zhang, B. Yao, S. Delikat, S. Bayoumy, X.H. Lin, S. Basu, M. McGinley, P.Y. Chan-Hui, H. Lichenstein and R. Kolesnick Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase, *Cell* 89 (1997) 63-72.
- [50] X. Yin, M. Zafrullah, H. Lee, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks and R. Kolesnick A ceramide-binding C1 domain mediates kinase suppressor of ras membrane translocation, *Cell Physiol Biochem* 24 (2009) 219-230.
- [51] N.A. Bourbon, J. Yun and M. Kester Ceramide directly activates protein kinase C zeta to regulate a stress-activated protein kinase signaling complex, *J Biol Chem* 275 (2000) 35617-35623.

- [52] J. Lozano, E. Berra, M.M. Municio, M.T. Diaz-Meco, I. Dominguez, L. Sanz and J. Moscat Protein kinase C zeta isoform is critical for kappa B-dependent promoter activation by sphingomyelinase, *J Biol Chem* 269 (1994) 19200-19202.
- [53] G. Muller, M. Ayoub, P. Storz, J. Rennecke, D. Fabbro and K. Pfizenmaier PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid, *Embo J* 14 (1995) 1961-1969.
- [54] T. Hirai and K. Chida Protein kinase Czeta (PKCzeta): activation mechanisms and cellular functions, *J Biochem* 133 (2003) 1-7.
- [55] M. Heinrich, J. Neumeyer, M. Jakob, C. Hallas, V. Tchikov, S. Winoto-Morbach, M. Wickel, W. Schneider-Brachert, A. Trauzold, A. Hethke and S. Schutze Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation, *Cell Death Differ* 11 (2004) 550-563.
- [56] L.D. Church, G. Hessler, J.E. Goodall, D.A. Rider, C.J. Workman, D.A. Vignali, P.A. Bacon, E. Gulbins and S.P. Young TNFR1-induced sphingomyelinase activation modulates TCR signaling by impairing store-operated Ca<sup>2+</sup> influx, *J Leukoc Biol* 78 (2005) 266-278.
- [57] A. Lepple-Wienhues, C. Belka, T. Laun, A. Jekle, B. Walter, U. Wieland, M. Welz, L. Heil, J. Kun, G. Busch, M. Weller, M. Bamberg, E. Gulbins and F. Lang Stimulation of CD95 (Fas) blocks T lymphocyte calcium channels through sphingomyelinase and sphingolipids, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 13795-13800.
- [58] I. Szabo, E. Gulbins, H. Apfel, X. Zhang, P. Barth, A.E. Busch, K. Schlottmann, O. Pongs and F. Lang Tyrosine phosphorylation-dependent suppression of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel in T lymphocytes upon Fas stimulation, *J Biol Chem* 271 (1996) 20465-20469.
- [59] K. Teshima, A. Yamamoto, K. Yamaoka, Y. Honda, S. Honda, T. Sasaki and S. Kojima Involvement of calcium ion in elevation of mRNA for gamma-glutamylcysteine synthetase (gamma-GCS) induced by low-dose gamma-rays, *Int J Radiat Biol* 76 (2000) 1631-1639.
- [60] D.W. Voehringer, M.D. Story, R.G. O'Neil and R.E. Meyn Modulating Ca<sup>2+</sup> in radiation-induced apoptosis suppresses DNA fragmentation but does not enhance clonogenic survival, *Int J Radiat Biol* 71 (1997) 237-243.
- [61] D.G. Todd, R.B. Mikkelsen, W.K. Rorrer, K. Valerie and R.K. Schmidt-Ullrich Ionizing radiation stimulates existing signal transduction pathways involving the activation of epidermal growth factor receptor and ERBB-3, and changes of intracellular calcium in A431 human squamous carcinoma cells, *J Recept Signal Transduct Res* 19 (1999) 885-908.
- [62] D.E. Hallahan, S. Virudachalam, M.L. Sherman, E. Huberman, D.W. Kufe and R.R. Weichselbaum Tumor necrosis factor gene expression is mediated by protein kinase C following activation by ionizing radiation, *Cancer Res* 51 (1991) 4565-4569.
- [63] G.E. Woloschak, P. Shearin-Jones and C.M. Chang-Liu Effects of ionizing radiation on expression of genes encoding cytoskeletal elements: kinetics and dose effects, *Mol Carcinog* 3 (1990) 374-378.
- [64] Y.C. Du, S. Gu, J. Zhou, T. Wang, H. Cai, M.A. Macinnes, E.M. Bradbury and X. Chen The dynamic alterations of H2AX complex during DNA repair detected by a proteomic approach reveal the critical roles of Ca(2+)/calmodulin in the ionizing radiation-induced cell cycle arrest, *Mol Cell Proteomics* 5 (2006) 1033-1044.
- [65] G.G. Zhai, R. Malhotra, M. Delaney, D. Latham, U. Nestler, M. Zhang, N. Mukherjee, Q. Song, P. Robe and A. Chakravarti Radiation enhances the invasive potential of primary glioblastoma cells via activation of the Rho signaling pathway, *J Neurooncol* 76 (2006) 227-237.

## Résultats : autres publications

---

- [66] N. Gupta, E. Nodzenski, N.N. Khodarev, J. Yu, L. Khorasani, M.A. Beckett, D.W. Kufe and R.R. Weichselbaum Angiostatin effects on endothelial cells mediated by ceramide and RhoA, *EMBO Rep* 2 (2001) 536-540.
- [67] B. Brenner, U. Koppenhoefer, C. Weinstock, O. Linderkamp, F. Lang and E. Gulbins Fas- or ceramide-induced apoptosis is mediated by a Rac1-regulated activation of Jun N-terminal kinase/p38 kinases and GADD153, *J Biol Chem* 272 (1997) 22173-22181.
- [68] M.A. del Pozo, N.B. Alderson, W.B. Kiosses, H.H. Chiang, R.G. Anderson and M.A. Schwartz Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains, *Science* 303 (2004) 839-842.
- [69] V. Haydont, C. Bourcier and M.C. Vozenin-Brotans Rho/ROCK pathway as a molecular target for modulation of intestinal radiation-induced toxicity, *Br J Radiol* 80 Spec No 1 (2007) S32-40.

# Discussion

---

## I. Au-delà du concept de cible primaire

Nos deux études s'inscrivent dans la continuité des travaux initiés par l'équipe de R. Kolesnick décrivant l'engagement de l'endothélium par les rayons ionisants. Ces travaux abordaient la question des effets biologiques des radiations à forte dose, peu explorés en raison de la prévalence de schémas d'irradiation fractionnée à faibles doses en clinique. Ils avaient pour point de départ l'observation d'une activation atypique du métabolisme sphingolipidique, la sphingomyélinase acide, dans un type cellulaire spécifique, les cellules endothéliales, lorsqu'une irradiation unique était appliquée à une dose suffisamment élevée (**Fuks et al., 1994**). Ils ont conduit à des découvertes majeures grâce à l'utilisation de souris knock-out de première génération pour la sphingomyélinase acide, p53, Bax ou Bak. Ceci a permis d'étudier l'impact des radiations à forte dose sur différents organes, révélant l'implication d'une destruction précoce de l'endothélium dans les atteintes cérébrales (**Pena et al., 2000**), pulmonaires (**Santana et al., 1996**) ou intestinales (**Paris et al., 2001a**). L'observation d'une vague rapide d'apoptose a conduit à modifier le concept de mort clonogénique des progéniteurs qui avait servi de cadre à l'explication de ce dernier syndrome : il démontrait l'existence d'un couplage entre l'apoptose médiée par la sphingomyélinase acide de l'endothélium microvasculaire, et la mort des progéniteurs. On basculait donc d'un modèle de cible unique des radiations, à un modèle de double-cible. Ce concept a été complété ensuite en montrant que l'ordre des cibles cellulaires de l'irradiation pouvait être modifié par intervention génétique (ou : « que des cibles supplémentaires existent mais leur impact est masqué par les cibles dont l'activation est la plus rapide »), indiquant que la sensibilité des voies de transduction propres à chaque type cellulaire pourrait conditionner la hiérarchie des cibles de l'irradiation, en tous cas au niveau de l'intestin (**Ch'ang et al., 2005**).

Si ces travaux ont mené à l'élaboration de deux concepts importants, la double-cible et le transfert de cible, ils laissent également un certain nombre de questions en suspens, parmi lesquelles :

Quels sont les événements moléculaires initiaux déclenchés par l'irradiation et conduisant à la mort des cellules endothéliales ?

Le transfert rapide des études vers des modèles animaux a en effet abouti à la situation paradoxale que le contexte de l'irradiation, dans lequel l'engagement de la sphingomyélinase acide a été le mieux défini à une échelle physiologique, est aussi très peu détaillé à l'échelle moléculaire.

Le statut de cible primaire de l'irradiation peut-il être examiné par des approches complémentaires à celles des publications initiales (invalidation de la sphingomyélinase acide et protection par le bFGF)?

Une importante controverse a notamment remis en cause la nature des cellules affectées par l'irradiation dans le syndrome gastro-intestinal, se basant à la fois sur des souris invalidées pour d'autres voies que la sphingomyélinase acide, Bax et Bak (**Qiu et al., 2008**) ou sur des techniques d'irradiation plus sélectives (**Schuller et al., 2007**).

Est-il possible de protéger de façon sélective l'endothélium de la destruction radioinduite ?

La limite entre toxicité intestinale et syndrome gastro-intestinal est définie/conditionnée par l'engagement du compartiment endothélial. La modulation de la vague d'apoptose frappant ce dernier semble plus aisée à accomplir que celle de la mort clonogénique par des approches pharmacologiques, et permettrait d'aboutir à une réduction de la sévérité du syndrome. Outre la

## Discussion

---

stricte faisabilité de l'approche, peu de données fonctionnelles existent pour montrer une protection spécifique de l'endothélium.

### 1) Comprendre le mécanisme de destruction vasculaire :

#### 1. Définition d'une séquence d'évènements partant de la membrane et conduisant à l'apoptose des cellules endothéliales

La première partie de nos travaux explore les mécanismes moléculaires conduisant à l'apoptose des cellules endothéliales exposées à une irradiation unique à forte dose. Nos travaux basés sur des modèles cellulaires montrent qu'une séquence d'évènements intervient durant la première demi-heure suivant l'irradiation et comprend :

Une externalisation de la sphingomyélinase acide, entraînant une génération rapide de céramide

Sous l'action du céramide, une profonde réorganisation membranaire, qui voit les radeaux membranaires se rassembler en de larges plateformes.

Ces plateformes agrégées contrôlent l'activation au niveau membranaire d'une voie pro-apoptotique médiée par la MAPK p38, qui aboutit à la vague de mort précoce affectant les cellules endothéliales.

Des résultats préliminaires montrent en outre que la cascade irradiation/sphingomyélinase acide/p38 est présente in vivo, au niveau intestinal.

Ces résultats confirment et hiérarchisent trois données majeures, obtenues dans des modèles parfois différents des cellules endothéliales :

- Le rôle du céramide dans le remodelage membranaire :

L'importance des travaux menés à la fois dans les membranes-modèles et lors de l'activation des récepteurs de type CD95 dans les cellules lymphoïdes a abouti à la reconnaissance de la capacité du céramide à entraîner la fusion des rafts.

La membrane plasmique comme cible de l'irradiation :

De nombreuses données expérimentales soulignent l'importance de la membrane plasmique dans la réponse aux radiations que celles-ci soient des radiations  $\gamma$  (lymphocytes B : **Santana et al., 1996**, oocytes : **Morita et al., 2000**, endothélium : **Haimovitz-Friedman et al., 1994**, carcinome : **Bionda et al., 2007**), des UVA (kératinocytes, **Grether-Beck et al., 2008**) ou C (**Elyassaki et Wu, 2006**, **Charruyer et al., 2005**, **Rotolo et al., 2005**). La plupart convergent vers un modèle unifié (**Gulbins et Kolesnick, 2003**), dans lequel les radiations génèrent des espèces radicalaires, qui provoquent l'externalisation la sphingomyélinase acide, entraînant une génération de céramide qui chasse le cholestérol hors des rafts. Dans un grand nombre de ces travaux, la modulation des rafts induite par le céramide conduit les cellules à l'apoptose.

- p38 comme voie de mort radioinduite dans l'endothélium :

Une pléthore de résultats connecte céramide et irradiation, mais selon des modalités très diverses, puisque la source (sphingomyélinase neutre ou acide), la topologie (membranaire, intracellulaire) et les cinétiques de génération du céramide sont très variables, et que les liens avec p38 divergent totalement suivant les modèles. Par contre, nous nous sommes appuyées sur deux études cohérentes montrant respectivement que le céramide et p38 servaient de relais à l'irradiation dans les cellules endothéliales (**Verheij et al., 1996** et **Kumar et al., 2004**).

Nos résultats montrent que la cascade irradiation/céramide/rafts s'applique aux cellules microvasculaires, expliquant par la même occasion l'origine membranaire du signal de mort, démontré de façon spectaculaire dans des préparations de membrane plasmiques de cellules endothéliales dépourvues de noyau (**Haimovitz-Friedman et al., 1994**). Ils confirment que l'évènement précédent l'externalisation de la sphingomyélinase acide serait d'origine radicalaire. Ils



## Discussion

---

montrent en outre que ce remodelage membranaire contrôlerait le déclenchement de la voie de mort p38 qui joue un rôle primordial dans la réponse des cellules endothéliales à l'irradiation.

2. Premier enjeu: quelles sont les bases moléculaires déterminant l'engagement d'une « cible critique » ?

### *Les chainons moléculaires manquants*

Si notre modèle propose une hiérarchie globale menant de l'irradiation à l'apoptose des cellules endothéliales, il n'en demeure pas moins lacunaire. Les principales étapes non déchiffrées à ce jour sont :

Le mécanisme précis conduisant à l'externalisation de la sphingomyélinase acide. On ne peut certes exclure des variations suivant les types cellulaires considérés. Il semble toutefois probable que démontrer de façon univoque le mécanisme conduisant une enzyme a priori stockée dans des vésicules lysosomiales à être externalisée massivement sur le feuillet externe de la membrane plasmique, dans les cellules endothéliales, puisse éclairer une grande partie des modèles basés sur un engagement du couple sphingomyélinase acide/céramide.

L'étape reliant le remodelage membranaire à l'activation de p38. Elle suppose à la fois de redéfinir le contrôle exercé par la membrane sur les voies de transduction, et d'identifier les intermédiaires moléculaires dans la cascade MAPK.

Le principal modèle existant à l'heure actuelle pour expliquer l'impact d'un remodelage membranaire sur une voie de transduction est issu des études de l'équipe d'E. Gulbins sur les récepteurs de la famille CD95. Il combine un mécanisme d'agrégation des rafts à la signalisation par un récepteur spécifiquement ségrégué au sein de ces rafts : ce récepteur semble être à la base de la spécificité des voies de transduction aval, qui ne conduisent pas toutes à l'apoptose. Dans le cadre de l'action de l'irradiation sur les cellules endothéliales, comprendre comment s'établit la spécificité de la transduction est plus compliqué, même si des oligomérisations de récepteurs peuvent intervenir sans ligand. Mais ce mécanisme ne pourra vraisemblablement être exploré que lorsque l'on aura identifié les intermédiaires moléculaires impliqués dans l'activation de p38.

Nos résultats montrent que l'activation de p38 coïncide avec celle de ses activateurs classiques MKK3 et 6, sans que nous disposions pour autant de données fonctionnelles permettant de les relier (dominants négatifs, sh RNA ou inhibition pharmacologique). Nous montrons également que MKK3 et 6 possèdent une localisation cytoplasmique cohérente avec un rôle de relais entre radeaux membranaires et p38. Pour autant, nous ne disposons pas d'éléments permettant d'éliminer une éventuelle intervention d'un mécanisme non canonique via une protéine scaffold type TAB1, ou de l'autre MAP2K MKK4, ou encore d'une régulation intervenant au sein du module supérieur, les MAP3K. Parmi elles, Ask1 constitue un candidat particulièrement intéressant. Le recrutement de cette kinase après une réorganisation membranaire a en effet déjà été montré (**Wu et al., 2008**). En outre, Ask est capable d'activer simultanément Jnk et p38 (**Ichijo et al., 1997**), et des résultats très proches des nôtres ont déjà mis en évidence une voie UV/raft/Jnk dans des cellules de lymphome (**Charruyer et al., 2005**). Il est donc possible que le mécanisme engage des activateurs communs aux deux voies, même si des interactions de plus en plus complexes entre les deux voies sont mises en évidence (**Wagner et Nebreda, 2009**). Ces résultats coïncideraient avec une observation réalisée dans les cellules endothéliales de macrovaisseaux : le peroxyde d'hydrogène y déclenche l'induction simultanée des deux voies pro-apoptotiques Jnk et p38, via Ask-1 (**Machino et al., 2003**).

- L'ampleur du contrôle exercé par le remodelage membranaire :

Notre approche s'est basée sur des indices existants indiquant un rôle essentiel de Jnk et p38 dans la mort des cellules endothéliales.

## Discussion

---

Toutefois, nous ne disposons d'aucune donnée permettant d'évaluer le nombre de voies qui sont affectées par le remodelage membranaire. Des approches plus globales seraient nécessaires, mais restent techniquement difficiles : les approches de transcriptomique ne permettront que d'évaluer l'impact de certaines voies de transduction aboutissant à la régulation de facteurs de transcription, or les effets des voies observées ici se situent très probablement en partie en dehors de tels effets. L'analyse globale de voies de transduction n'en est qu'à ses prémises (par exemple, en utilisant des approches de spectrométrie de masse pour identifier les altérations de phosphorylation dans le kinome, **Dephore et al., 2008** et **Daub et al., 2008**). Il faudrait combiner ces approches, permettant de délimiter les réseaux de transduction qui sont perturbés par l'irradiation, à des techniques d'inhibition du remodelage membranaire.

- La connexion entre p38 et apoptose.

S'il existe un consensus sur la capacité des voies Jnk et p38 à déclencher l'apoptose, les résultats dans différents systèmes cellulaires abondent sans aboutir à la définition de voies canoniques. In vivo, le signal apoptotique déclenché par l'irradiation semble aboutir aux relais mitochondriaux canoniques Bax et Bak, mais les relais menant de p38 à ces protéines sont inconnus et les candidats nombreux (**Corre et al.**, manuscrit joint).

### ***La modélisation et les cibles critiques***

Mener ces résultats plus loin supposera également de les replacer dans un cadre spatio-temporel plus détaillé. D'abord parce qu'il s'agit clairement d'un des enjeux majeurs de la signalisation : parvenir à une caractérisation des voies de transduction affinées à une échelle intracellulaire. Ensuite parce qu'en y intégrant des données quantitatives, ces données spatiales et temporelles peuvent servir de base à une modélisation des voies de transduction, et qu'un système dans lequel le déclenchement des voies de transduction serait guidé par un remodelage membranaire, constituerait une alternative intéressante à la signalisation émanant d'un récepteur décrite dans les travaux séminaux sur les MAPK (**Sauro et Kholodenko, 2004**). Obtenir de telles données suppose des procédés d'imagerie à haute résolution, conjugués avec l'utilisation de marqueurs mimant au mieux les propriétés des lipides (**Van Meer, Liskamp, 2005**).

Au-delà de cette perspective intéressant essentiellement le champ de la transduction, une modélisation de la voie de mort à l'œuvre dans les cellules endothéliales pourrait constituer une stratégie pour résoudre un problème complexe : quels sont les déterminants biologiques qui conduisent un type cellulaire donné, notamment dans le cadre du syndrome gastro-intestinal, à devenir une « cible critique » (**Ch'ang et al., 2005**) ? Si on dispose d'indices montrant le maintien sous contrôle de certaines voies (comme la céramide synthase dans les progéniteurs), on ignore dans quelle mesure l'amplitude et la vitesse de réponse des voies pourraient déterminer quel type cellulaire devient une cible critique. Par exemple, il serait très intéressant de parvenir à une caractérisation quantitative du remodelage membranaire dans les cellules endothéliales : ce phénomène est-il beaucoup plus marqué que dans les réorganisations induites par les récepteurs par exemple dans d'autres systèmes ? Il constituerait alors une forme de codage du signal, et de telles données pourraient même servir d'approche complémentaire au déchiffrement moléculaire de la voie de mort.

3. Second enjeu : remaniements membranaires, des modèles in vitro aux études in vivo

Le second enjeu sous-jacent à cette étude est celui du franchissement d'échelle, notamment en ce qui concerne les phénomènes de réorganisation membranaire. Le décryptage des voies de

## Discussion

---

transduction comme la visualisation des membranes sont en effet largement restreints aux approches biochimiques ou cellulaires : on constate que les travaux menés en parallèle dans des modèles cellulaires et *in vivo* consistent le plus souvent en une étude approfondie dans les modèles cellulaires, avec l'ensemble des outils permettant d'étudier la signalisation (western blots, inhibitions par sh RNA/inhibiteur pharmacologique ou dominant négatif) ou les rafts (marquages des radeaux membranaires, voire FRET, et parfois techniques d'isolement par fractionnement) tandis que la modulation du remodelage membranaire, par exemple par injection de drogues inhibitrices comme les chélatants du cholestérol, est limitée à des approches sur organes isolés (**Göggel et al., 2004**).

Les techniques de visualisation sont limitées pour la transduction aux marquages immunohistochimiques (exceptés les quelques modèles les plus poussés de souris exprimant des reporters fluorescents sous le contrôle de promoteurs endogènes, décrits ci-dessous), et dans le domaine des remaniements membranaires, on retrouve des approches de dosage du céramide (**Santana et al., 1996**), d'extraction des rafts (**Cuadras et Greenberg, 2003**), mais très rarement des marquages du céramide (**Teichgraber et al., 2008**), et jamais de mise en évidence des plateformes lipidiques. Des résultats prometteurs ont permis de révéler la distribution des récepteurs des leucocytes par microscopie intravitale (**Chiang et al., 2007**), mais le saut n'a pas été franchi pour les rafts.

#### 4. Troisième enjeu : vers des souris KO de « seconde génération » : les KO conditionnels tissus-spécifiques

Le dernier enjeu ayant trait à l'exploration des mécanismes de destruction de l'endothélium que nous allons aborder concerne le recours à des modèles de souris transgéniques. Comme il a été expliqué en introduction et dans la première partie de cette discussion, notre domaine d'étude a connu une évolution rapide grâce à l'utilisation de souris invalidées pour la sphingomyélinase acide (mais aussi p53, ou ATM) de première génération (c'est-à-dire dans lesquelles l'invalidation affectait tous les types cellulaires, dès la formation de l'embryon). Pour l'heure, tenants comme détracteurs (**Qiu et al., 2008**) de la théorie de la double cible n'ont travaillé qu'avec des souris de première génération. Désormais, les modèles murins évoluent vers la mise en place de knock-out spécifiques d'un type cellulaire, voire de systèmes inductibles et parfois même réversibles (**Frese et Tuveson, 2007**). La construction d'une souris dans laquelle la sphingomyélinase acide serait invalidée spécifiquement dans l'endothélium, et si possible de façon inductible, permettrait certainement, en évitant les problèmes de compensation de la déficience comme les effets croisés entre type cellulaire, de parvenir à un consensus sur la place de l'endothélium comme cible primaire des radiations à forte dose. L'exemple à suivre dans ce cas est sûrement celui de p53, champ marqué par les résultats contradictoires mais qui a été considérablement éclairci par l'avènement de systèmes inductibles et réversibles (**Christophorou et al., 2005**, par exemple). Au-delà de la sphingomyélinase acide, de tels systèmes d'invalidation restreinte, ou des knock-in, par exemple visant p38, permettront également l'exploration de la transduction menant à la mort de l'endothélium. De tels modèles sont désormais envisageables pour p38 (puisque les souris Lox-p38 sont disponibles), mais pas encore pour la sphingomyélinase acide.

#### 2) Etre capable de moduler cette destruction vasculaire :

## Discussion

---

1. Bilan : un agent pharmacologique, inhibant la vague de mort précoce des cellules endothéliales, s'étendant au tissu par le jeu du couplage vasculaire/clonogénique

Dans l'article constituant la seconde partie de cette thèse, nous explorons le potentiel de la S1P comme modulateur de la destruction de l'endothélium décrite précédemment.

Nos résultats démontrent la capacité de la S1P à protéger les cellules endothéliales de la vague de mort précoce radioinduite déclenchée par l'irradiation, *in vitro* et *in vivo*. L'action de la S1P est spécifique de l'endothélium, et médiée par des récepteurs et une activation de la voie Akt. Elle résulte en une abrogation du syndrome gastro-intestinal. Ceci conduit à un basculement dans les syndromes affectant les souris irradiées, qui voient leur survie prolongée jusqu'au déclenchement du syndrome hématopoïétique. En combinant abrogation du syndrome gastro-intestinal par la S1P, et du syndrome hématopoïétique par greffe de moelle osseuse, on parvient à conserver une longévité supérieure à 100 pour plus de 60 % des souris irradiées à 15 Gy.

2. Premier enjeu : sur quelle(s) base(s) s'établit la spécificité d'action de la S1P ?

L'une des principales questions ouvertes par notre étude est celle des bases cellulaires ou moléculaires par lesquelles s'établit la spécificité d'action de la S1P, et ce non seulement pour expliquer son effet de protection, mais également l'activation localisée spectaculaire d'Akt. Un certain nombre de paramètres pourraient être impliqués dans cette propriété de la S1P, parmi lesquels :

- Un déterminant pharmacodynamique :

Notre stratégie consiste à augmenter la concentration d'un facteur présent physiologiquement dans le sérum.

La S1P est en effet abondante dans le sérum (de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ) (**Yatomi *et al.*, 1997**). Elle est certes majoritairement complexée à l'albumine et aux HDL (**Aoki *et al.*, 2005**), mais il est possible que cette fixation n'affecte pas son activité biologique (**Tigyi et Miledi, 1992**), et la concentration de S1P libre dans le sérum (15 à 45 nM) dépasse largement l'IC<sub>50</sub> (0.5 nM) déterminé *in vitro* pour l'EDG1 (**Camerer *et al.*, 2009**). Cette concentration élevée la différencierait de nombre de facteurs de croissance polypeptidiques, présents dans le plasma à des concentrations très inférieures à leur seuil d'efficacité. Une publication récente montre notamment que l'ajout d'un superagoniste de l'EDG1 ne permet pas de potentialiser l'effet de la S1P systémique, alors qu'un agoniste d'un récepteur complémentaire y parvient (**Camerer *et al.*, 2009**). Ceci semble questionner l'impact des injections de S1P que nous réalisons dans notre modèle murin : si la S1P est déjà extrêmement élevée, comment la S1P supplémentaire peut-elle avoir un impact ?

Nous ne disposons pas de données expérimentales permettant de répondre directement à ce problème. Il faut cependant noter que la question de la biodistribution de la S1P n'est pas close. On sait que des gradients très stricts sont maintenus entre plasma, lymphe (de l'ordre de 200 nM) et espace interstitiel (inférieur au nM) (**Maceyka *et al.*, 2009**). Le maintien de gradients locaux joue un rôle majeur dans la régulation de la migration des lymphocytes, et les modèles s'affinent de plus en plus pour en montrer l'importance : ainsi, dans l'intestin, les plaques de Peyer constituent-elles des sources de S1P, à l'opposé de la lamina propria environnante, permettant de réguler la migration des lymphoblastes entre ces deux zones (**Gohda *et al.*, 2008**). Les études des variations locales de la concentration en S1P ne sont pas closes, que ce soit dans les tissus interstitiels et peut-être également dans la microcirculation. Seule une image plus précise de ces répartitions nous permettrait de comprendre si les injections aboutissent à une élévation sensible de la S1P dans les microvaisseaux intestinaux.

## Discussion

---

Il est également possible que le positionnement des cellules endothéliales contribue à une exposition à des doses importantes de S1P par rapport aux autres types cellulaires, mais également contribue à déclencher une voie de survie efficace dans les cellules endothéliales.

- Le répertoire et la densité des récepteurs à la S1P :

L'action de la S1P sur les cellules endothéliales est médiée par des récepteurs couplés aux protéines G. Les candidats les plus logiques sont les récepteurs EDG-1/3/5/6/8, spécifiques de la S1P. Dans l'endothélium, le panel des isoformes d'EDG sensibles à la S1P se restreint a priori à EDG1, 3 et 5 (**Lee et al., 1999** et **Morales-Ruiz et al., 2001**),

Nos propres données préliminaires indiquent que les cellules HMEC-1 expriment effectivement les ARNm (RT-PCR) et les protéines (western blot) correspondant aux EDG-1,3 et 5, même si étant donnée la perte de différenciation associée à la culture des cellules endothéliales (**Dropulic et Masters, 1987**), et l'origine dermique de ces cellules, la validation la plus pertinente serait par hybridation in situ sur la lamina propria murine, afin d'établir le répertoire des EDG présents dans ce lit vasculaire spécifique.

Les données récentes indiquent que si la forte concentration de S1P plasmatique aboutit à une occupation basale des EDG, elle est néanmoins insuffisante pour aboutir à une répression complète des récepteurs en surface des cellules endothéliales, à la différence d'un traitement prolongé par un superagoniste pharmacologique (**Camerer et al., 2009**).

Les cellules endothéliales expriment abondamment EDG1 (**Lee et al., 1996**). Ce dernier semble jouer un rôle prédominant dans la réponse à la S1P (**Camerer et al., 2009**), et à ce titre nos résultats sont parfaitement en phase avec le consensus sur l'importance de la voie S1P/RCPG/Gi dans l'endothélium (**Morales-Ruiz et al., 2001**, et **Camerer et al., 2009**).

On sait en outre que chaque récepteur EDG active un répertoire particulier de protéines hétérotrimériques G (**Ancellin et Hla, 1999**). Ceci conditionne les voies aval contactées (par exemple, les EDG aboutissent à une activation de l'isoforme  $\beta$  de la Pi3K, alors que le VEGF active les deux isoformes,  $\alpha$  et  $\beta$ , dans les cellules endothéliales- **Igarashi et Michel, 2001**).

- L'efficacité du couplage récepteurs/voies aval :

Ce paramètre est complémentaire au précédent : si la qualité des récepteurs engagés par la S1P conditionne en partie le type de signalisation aval, il est également clair que celle-ci est fortement modulée par la disponibilité des intermédiaires moléculaires, et les autres voies actives à l'intérieur des cellules endothéliales. Définir de tels paramètres in vitro se heurte aux difficultés évoquées précédemment pour évaluer les voies de transduction de façon globale, mais peut permettre de caractériser la réponse à la S1P en termes de cinétique, de dose-réponse et d'efficacité sur les effecteurs en aval, des paramètres qui demeurent difficiles à évaluer in vivo. L'activation de Akt peut résulter de chacun des trois paramètres décrits jusqu'alors, isolément ou combinés. La combinaison de ces paramètres qualitatifs (répertoire) et quantitatif (abondance de chaque espèce moléculaire) pourrait contribuer à l'efficacité de la signalisation pro-survie dans les cellules endothéliales. On sait en particulier que les cellules endothéliales répondent à des quantités faibles de S1P (nM).

- Le type de mécanisme de mort adverse : ce quatrième paramètre provient d'un renversement de la question. Même si les cellules ne bénéficiaient d'aucune exposition privilégiée à la S1P, d'aucun répertoire spécifique ou abondant de récepteurs, et d'aucun relais moléculaire privilégié vers les voies de survie, il reste possible que la spécificité d'action de la S1P sur la l'endothélium résulte non pas d'une action restreinte ou particulièrement efficace, mais de la particularité de la voie de mort à l'œuvre dans les cellules endothéliales. En d'autres termes, la question qui se poserait alors serait : l'impact de la S1P sur les autres types cellulaires n'est-il pas indétectable parce que ces derniers ne sont pas confrontés à un mécanisme de mort directe, non clonogénique, comme celui médié par la sphingomyélinase acide ?

## Discussion

---

### 3. Second enjeu: La S1P, un agent de protection de l'endothélium sain

Nos travaux permettent d'attribuer à la S1P un rôle pharmacologique et systémique nouveau, qui vient s'ajouter à la modulation de la migration lymphocytaire, jusqu'à présent principal cible de développement pharmacologique (FTY720/fingolimod). De façon notable, ce nouveau rôle n'apparaît qu'à partir du moment où l'on engage la mort de l'endothélium, dans notre modèle par une irradiation unique haute dose ou par un choc septique induit par une dose massive de TNF.

Nous nous sommes placés, pour le premier de ces signaux, dans le cadre d'une irradiation corporelle totale, et l'application la plus évidente de ces résultats est le traitement du syndrome gastro-intestinal : bien que le nombre d'accidents conduisant à de telles irradiations est très restreint, le traitement de ce syndrome reste extrêmement difficile. Nos travaux suggèrent qu'en jouant sur l'apoptose de l'endothélium plutôt que sur la mort des cellules clonogéniques, difficile à moduler, on pourrait atténuer la sévérité des symptômes du syndrome gastro-intestinal. Mais cela suppose d'abord de parvenir à une protection en administrant la S1P uniquement post-irradiation. Nos résultats ouvrent également une double question : peut-on étendre le rôle protecteur de la S1P à d'autres contextes d'engagement de la mort de l'endothélium ? Nos travaux indiquent-ils un rôle généralisé des facteurs pro-angiogéniques dans la protection vasculaire ?

L'utilisation de la S1P comme radioprotecteur pourrait être étendue aux modèles dans lesquels l'apoptose de l'endothélium constitue un événement primaire. Outre le syndrome gastro-intestinal (**Paris et al., 2001a**) et le choc septique (**Haimovitz-Friedman et al., 1997**), les travaux initiaux de l'équipe de Kolesnick et des travaux récents ont montré une intervention de la mort radioinduite de l'endothélium, dans les poumons et la barrière hémato-encéphalique (**Paris et al., 2001a, Santana et al., 1996, Pena et al., 2000**), ainsi que lors de l'administration de doses élevées de chimiothérapie (**Rebillard et al., 2008** et nos propres résultats). A nouveau, la S1P pourrait être utile pour bloquer ces dégâts à l'endothélium.

Le développement de nouveaux outils comme des superagonistes d'EDG1 utilisables *in vivo*, ou des souris dont les niveaux de S1P plasmatiques sont fortement abaissés doivent permettre d'approfondir ces concepts (**Pappu et al., 2007**, et **Camerer et al., 2009**).

### 4. Troisième enjeu : Une fonction de protection généralisable à tous les facteurs pro-angiogéniques ?

La seconde perspective ouverte par ces travaux sur la S1P est de considérer dans quelle mesure tous les facteurs pro-angiogéniques possèdent un potentiel pharmacologique de protection de l'endothélium.

Un facteur pro-angiogénique possède en général des propriétés *in vitro* (induction de la prolifération, de la migration, de structures de type capillaires dans les cellules endothéliales) et d'essais *in vivo* (néoangiogenèse sur des blocs de matrigel notamment). Ces travaux ont été complétés par l'invalidation génétique des différents facteurs, conduisant à un défaut de vascularisation embryonnaire. Cette validation à niveaux multiples a permis de définir les systèmes VEGF/VEGFR (*in vitro* : **Connolly et al., 1989**, *in vivo* : **Maltepe et al., 1997**), Ang/Tie (*in vitro* : **Papapetroulos et al., 2000**, *in vivo* : **Suri et al., 1996**) comme les archétypes des facteurs angiogéniques. Sont venus s'ajouter également la S1P (*in vitro* : **Wang et al., 1999** et **Moralez-Ruiz et al., 2001**- *in vivo* : **Liu et al., 2000**) puis d'autres facteurs de croissance comme le FGF (*in vitro* : **Lee et al., 2000** et *in vivo* :

## Discussion

---

Rousseau *et al.*, 2002), le HGF (in vitro : Morimoto *et al.*, 1991 et seulement par des essais d'angiogenèse in vivo: Bussolino *et al.*, 1992), et l'éphrine B2 (in vitro : Mansson-Broberg *et al.*, 2008 et in vivo : avec des essais d'angiogenèse seulement : Maekawa *et al.*, 2003). Le rôle du TGF est moins clair, et les cellules endothéliales portent le PDGF plutôt que son récepteur, même si le système PDGF/PDGFR est l'un des mieux étudiés dans la régulation de l'angiogenèse.

Or, on constate qu'outre les propriétés classiques de migration, prolifération et régulation de la morphologie, les facteurs pro-angiogéniques possèdent quasiment tous la capacité à induire via Akt des voies pro-survie dans les cellules endothéliales in vitro (Liu *et al.*, 2000a et Liu *et al.*, 2002). Ceci est vérifié pour le VEGF (Gerber *et al.*, 1998), l'angiopoïétine (Fujikawa *et al.*, 1999), la S1P (Igarashi et Michel, 2001 et Kwon *et al.*, 2001), le FGF (Matsunaga *et al.*, 2009), et le HGF (Ma *et al.*, 2002). Cette propriété apparemment générale est cohérente avec le rôle de protection exercé par ces facteurs dans différents contextes d'atteintes à l'endothélium :

D'abord, deux facteurs ont démontré leur action dans le cadre de modèles où l'endothélium est la cible primaire. Le bFGF inhibe l'apoptose induite lors du choc septique (Haimovitz-Friedman *et al.*, 1997), mais aussi le syndrome gastro-intestinal (Paris *et al.*, 2001a), tout comme une forme améliorée de l'Ang-1 (Cho *et al.*, 2004). Une protection de l'intestin a également été montrée en utilisant une combinaison de VEGF et de bFGF avant une irradiation corporelle totale (Okunieff *et al.*, 1998). En outre, le HGF atténue l'atteinte aux vaisseaux dans un modèle d'ischémie cérébrale (Date *et al.*, 2004), et le composé basé sur l'angiopoïétine-1 atténue la toxicité rénale liée au cyclophosphamide, toujours via un effet vasculaire (Lee *et al.*, 2008). Nos résultats avec la S1P, protégeant à la fois du syndrome gastro-intestinal et du choc septique, sont reliés aux résultats in vitro par le rôle central qu'y joue Akt.

Ces données semblent indiquer qu'une utilisation d'une large gamme de facteurs pro-angiogéniques est possible pour contrer un grand nombre de situations délétères pour la vascularisation. Il faut toutefois rester prudent car les facteurs pro-angiogéniques ont principalement été étudiés par leur intervention dans la vascularisation embryonnaire. Leur rôle dans la vascularisation établie est moins bien défini (par exemple, Peters *et al.*, 2004) : quelles sont les nouvelles fonctions que contrôlent alors les facteurs pro-angiogéniques (par exemple, la perméabilité vasculaire) ? Comment ces fonctions sont-elles modulées par les effets d'équilibre qui s'opèrent en raison de l'abondance des différents facteurs (Camerer *et al.*, 2009) ? Comment les facteurs interagissent-ils les uns avec les autres ? Tous ces paramètres pourraient limiter l'utilisation pharmacologique des facteurs pro-angiogéniques.

## II. Quelle jonction avec les traitements anticancéreux ?

La question ici est de savoir dans quelles limites/à quelles conditions nos résultats sont applicables.

### 1) Rappel : principe d'action des thérapies anti-cancéreuses

Les thérapies anticancéreuses se sont développées comme des traitements à « large échelle » (systémique pour les chimiothérapies, à l'échelle de l'organe pour la radiothérapie), et affectent donc les tissus sains en plus des cellules tumorales. Dans cette perspective, un enjeu majeur de ces thérapies a été de trouver des traitements ou des modalités de traitements capables de maximiser les dégâts infligés aux cellules tumorales en limitant les dommages aux tissus sains. Ceci a été réalisé en s'appuyant sur un nombre restreint de différences entre cellules tumorales et tissu sain : vitesse de prolifération, capacités de réparation des dommages à l'ADN, parfois dépendance à certaines lésions oncogéniques comme Erbb2.

## Discussion

---

Dans cette optique, le tissu sain était considéré comme un ensemble homogène. Le concept de ciblage d'une partie du microenvironnement impliqué dans la croissance tumorale, tel que prédit par Folkman, n'a, nous l'avons détaillé dans l'introduction, pas conduit à un basculement des thérapies vers un ciblage spécifique du microenvironnement. A l'heure actuelle, les effets des thérapies sont, au mieux, concomitamment anti-vasculaires ou anti-angiogéniques, sans qu'on distingue même très clairement ces effets (exemples du Bortezomib ou de l'Avastin), qui se mêlent en plus à des effets de sensibilisation des cellules tumorales elles mêmes. Notre approche est à ce titre originale, puisque elle place au cœur de sa démarche l'effet anti-vasculaire des rayonnements.

### 2) Application à l'homme :

Nous allons à présent tenter de définir les principaux paramètres qui détermineront l'impact de nos résultats sur les traitements par radiothérapie.

#### 1. L'engagement de l'endothélium en clinique

Le premier d'entre eux consiste à déterminer dans quelle mesure le modèle d'engagement de la mort de l'endothélium s'applique aux situations de traitements des tumeurs humaines. Cela dépendra, nous l'avons vu en introduction, de l'évolution des techniques et des protocoles d'irradiation vers les hautes doses, mais au-delà de cet aspect pratique, il s'agit également de s'assurer que les déterminants moléculaires qui font de l'endothélium une cible primaire dans les modèles murins sont également à l'œuvre chez l'homme. Une étape intermédiaire peut consister à valider le modèle de l'engagement de l'endothélium dans des modèles de tumeurs murines spontanées et non xénogreffées. Si nos résultats s'avéraient validés dans ces différents modèles, le transfert des concepts élaborés dans des modèles très fondamentaux serait accéléré.

#### 2. Le statut de l'axe sphingosine kinase/sphingosine-1-phosphate dans les tumeurs

La place jouée par le couple sphingosine kinase/S1P dans la tumorigénèse a été profondément réévaluée au cours de la décennie écoulée.

Les études ont montré que :

sur des lignées cellulaires : l'expression de la sphingosine kinase survenait au cours de la transformation cellulaire par h-Ras, et la surexpression de la sphingosine kinase accélérât la transformation cellulaire (**Xia, et al., 2000**), tandis que son inhibition sensibilise de nombreuses lignées cellulaires aux chimiothérapies (**Visentin et al., 2006, Pchetjeski et al., 2008**). On constate inversement que l'expression de l'enzyme est corrélée à la résistance aux chimiothérapies (**Bonhoure et al., 2006, Baran et al., 2007 et Li et al., Oncogene, 2007**).

Sur des modèles animaux : dans de nombreux modèles de tumeurs xénogreffées, l'injection de cellules surexprimant la sphingosine kinase accroît leur potentiel tumorigénique (**Xia et al., 2000, Nava et al., 2002 et Paugh et al., 2008**). En outre, dans un modèle de tumeur chimio-induite du colon, chez le rat (**Kawamori et al., 2006**), et de leucémie induite par activation d'un oncogène chez la souris (**LeScolan et al., 2005**), la progression tumorale s'accompagne d'une surexpression de la sphingosine kinase.

Sur des tumeurs humaines : l'expression de la sphingosine kinase a été démontrée dans un vaste panel d'échantillons en ARNm (cancer du sein, colon, poumon, ovaire, utérus, rein et rectum – **French et al., 2003**) et en ARNm et protéine (cancer bronchique non à petites cellules, **Johnson et al., 2005**- tumeur colique **Kawamori et al., 2009**). Dans ce dernier type de tumeur, on note également une baisse de l'expression de la sphingosine lyase, conduisant elle-aussi à l'accumulation de S1P



## Discussion

---

(*Oskouian et al., 2006*). Enfin, un nombre croissant d'études montrent la corrélation entre expression de la sphingosine kinase et gravité du stade tumoral ou du pronostic : astrocytomes (*Van Brocklyn et al., 2005* et *Li et al., 2008*), cancer gastrique (*Li et al., 2009*), cancer du sein (*Rückhaberle et al., 2008*) et lymphome non hodgkinien (*Bayerl et al., 2008*).

La sphingosine kinase a donc acquis un statut d'oncoenzyme (*Vadas et al., 2008*), donc de cible thérapeutique potentielle (*Shida et al., 2008*) mais il reste à étudier si cette expression, qui affecte certainement les niveaux de S1P intra-tumoraux, module les niveaux de S1P présents dans le microenvironnement tumoral, et comment cela impacte le niveau d'EDG présents sur la vascularisation.

### 3. L'hétérogénéité de l'endothélium tumoral.

Nos travaux ont utilisé un modèle murin dans lequel la vascularisation est mature et quiescente, et soumise à une irradiation haute dose. Leur application la plus évidente est donc, nous l'avons discuté, la radioprotection. Leur portée en radiothérapie sera, quant à elle, très dépendante du statut de la vascularisation tumorale, combiné au paramètre précédent, la présence de S1P dans le microenvironnement.

Dans le cadre de tumeurs ne produisant pas ou peu de S1P, l'importance de l'hétérogénéité de l'endothélium doit être évaluée : si la tumeur possède une vascularisation avec une large portion angiogénique, comme dans les glioblastomes ou les carcinomes rénaux (plutôt associée aux tumeurs à croissance rapide) (*Eberhard et al., 2000*), alors la S1P pourrait servir à protéger les vaisseaux sains (si tant est que les effets de toxicité liés à la mort de l'endothélium soient atteints en clinique). Par contre, si la vascularisation de ces tumeurs est largement quiescente, comme dans les carcinomes prostatiques ou pulmonaires, l'application de nos travaux sera plus limitée.

Enfin, si l'on travaille sur des tumeurs créant un environnement riche en S1P, des approches visant à bloquer la S1P (*Visentin et al., 2006*) pourraient sensibiliser la portion quiescente des vaisseaux sanguins. La portion angiogénique est, quant à elle, plus sensible à la mort clonogénique radioinduite (*Bonnaud et al., 2007*).

La construction de souris dont les niveaux de S1P plasmatiques peuvent être abaissés ouvre des perspectives très intéressantes de ce point de vue, et pourrait être couplée à des modèles de tumorigénèse pour approfondir le potentiel de la S1P comme cible thérapeutique dans les protocoles de radiothérapie. De tels modèles hybrides devraient permettre en outre d'évaluer les effets secondaires liés aux rôles physiologiques joués par la S1P, comme la régulation de la perméabilité vasculaire (*Camerer et al., 2009*).

### 4. L'impact des thérapies anti-vasculaires

Nos études sont centrées sur la destruction de l'endothélium. La vascularisation tumorale a été l'objet de recherches considérables depuis 20 ans, principalement axées sur les traitements anti-angiogéniques. Ces thérapies ont généré des espoirs considérables, le ciblage d'un compartiment du microenvironnement permettant d'envisager une thérapie sans équivalent physiologique, à effets démultipliés, insensible à l'acquisition de résistances, et dont la cible est facilement accessible (*Eberhard et al., 2000*).

Pourtant, avec la progression des études et en particulier le développement des molécules anti-angiogéniques comme l'anticorps bevacizumab, un certain nombre de limites sont apparues :

## Discussion

---

- L'impossibilité d'utiliser ces molécules comme agent simple. Aucun essai de phase III n'a permis de concrétiser les nombreux résultats obtenus avec des études précliniques, l'efficacité du traitement ne dépassant pas celle de la chimiothérapie de référence (**Jain et al., 2006**).
- Des bénéfices limités. En dépit des résultats prometteurs in vitro, les bénéfices du bevacuzimab se sont avérés limités. Il n'apporte aux patients un gain de survie que d'environ deux mois, dans un nombre restreint de tumeurs, notamment colorectales et pulmonaires, toujours en combinaison avec une chimiothérapie (**Hurwitz et al., 2004**).
- Des effets secondaires peu nombreux mais sévères : perforation intestinale, thrombose, hémorragies.

De telles limites soulignent un certain nombre de carences techniques et conceptuelles :

- L'angiogenèse physiologique elle-même est un processus connu par l'étude d'une série non exhaustive de systèmes moléculaires. De nombreux mécanismes complémentaires pourraient compléter notre vision de l'angiogenèse et donc nos approches pour la bloquer lorsqu'elle est détournée par les tumeurs (**Wallgard et al., 2008**). Ils pourraient également fournir les marqueurs qui font cruellement défaut pour suivre l'efficacité des traitements anti-angiogéniques.
- Les modèles animaux d'angiogenèse tumorale peuvent être améliorés. Les modèles de xénogreffes aboutissent à des tumeurs rapides, donc très mal implantées dans leur microenvironnement, et dont les niveaux de prolifération et de maturation vasculaire divergent profondément des tumeurs humaines (**Eberhard et al., 2000**).
- Des résultats croissants soulignent l'apparition de résistances ou d'évasion aux thérapies anti-angiogéniques (**Casanovas et al., 2005** et **Bergers et Hanahan, 2008**), mais également l'impact délétère que pourra avoir cette stratégie sur la sélection de variants tumoraux plus agressifs (**Monnier et al., 2008** et **Paez-Ribes et al., 2009**).

Une question cruciale est celle du mécanisme réel d'action des anti-angiogéniques. Ils sont supposés priver la tumeur d'oxygène et de nutriments, mais dans les combinaisons utilisées en clinique, le bevacuzimab est systématiquement ajouté à une chimiothérapie. Ceci a donné naissance à une explication alternative : la normalisation, dans laquelle les anti-angiogéniques, en s'attaquant aux portions immatures de la vascularisation tumorale, permettrait à celle-ci d'être constituée de moins de vaisseaux, plus rectilignes : elle délivrerait alors plus efficacement les agents chimiothérapeutiques ou l'oxygène, base de l'efficacité de la radiothérapie (**Jain, 2005**). Ce concept a été ensuite appuyé par des études dans des modèles murins de xénogreffes (**Winkler et al., 2004**) et chez les patients (**Batchelor et al., 2007**), qui montrent qu'une administration d'anti-angiogéniques à des doses mesurées permet d'aboutir temporairement à un réseau vasculaire plus régulier, qui ménage une fenêtre thérapeutique pour l'action d'agents chimiques ou de radiations.

Ces résultats soulignent que les approches anti-angiogéniques ont rencontré beaucoup plus de difficultés que prévu. Notre modèle emprunte à la fois à ces approches (ce sont les microvaisseaux qui sont la cible primaire de l'irradiation) mais aussi aux agents dits antivasculaires. Ces agents affectent la vascularisation tumorale mature, et nous ne savons pas dans quelle mesure le degré de maturation de l'endothélium dans les tumeurs impactera leur destruction par l'irradiation haute dose, de même que nous ignorons si un endothélium possédant un certain degré de maturation, (c'est-à-dire couvert de péricytes), donc d'indépendance vis-à-vis des facteurs pro-angiogéniques, pourrait être sensibilisé à la mort par l'irradiation haute dose si on applique des agents anti-S1P. Quoique les études les concernant soient bien moins avancées que celles des agents anti-angiogéniques, un certain nombre des principes gouvernant leur action commencent à émerger. Ces agents semblent en effet provoquer un effondrement vasculaire qui atteint le cœur de la tumeur, par

## Discussion

---

un mécanisme mal compris, dans lequel l'occlusion des vaisseaux s'accompagnerait d'un évènement pro-thrombotique (**Tozer et al., 2005**). Etudier la répartition de la mort au cœur des tumeurs suite à l'irradiation haute dose nous permettrait de savoir si effectivement les modèles d'agents anti-vasculaires sont pertinents pour notre modèle. Il est à noter qu'on connaît mal les possibilités de combinaison des agents anti-vasculaires avec d'autres thérapies : de telles combinaisons se sont avérées plutôt efficaces en modèles précliniques (**Siemann et Rojani, 2002** et **Curnis et al., 2002**), mais sans que l'on sache précisément ce qui sous-tend l'efficacité de ces associations. Les agents anti-vasculaires semblent en effet provoquer après 24h une baisse de la pression intra-tumorale (**Bouzin et Féron, 2007**). Mais ils aboutissent également au maintien d'une ceinture de cellules cancéreuses viables en périphérie de la tumeur. Ces cellules sont a priori plus accessibles aux traitements, mais les résultats montrant l'acquisition de résistance ou de phénotypes métastatiques après traitements anti-angiogéniques doivent inciter à la prudence.

L'amélioration du ciblage permet aux cliniciens d'envisager d'atteindre des doses élevées, à la fois tumoricides et anti-vasculaires. Ceci présage d'une évolution séparée entre des tumeurs très localisées où l'on puisse augmenter significativement les doses, et des zones de fort éparpillement tumoral dans lesquelles on irait au contraire vers un hyper-fractionnement.

Nous avons évoqué les paramètres qui conditionneront l'application de nos résultats aux traitements par radiothérapie des tumeurs. La partie suivante sera consacrée à l'étude des cibles moléculaires mises en évidence par notre étude, p38 et Akt.

### 3) Les voies mises en évidence peuvent-elles constituer des cibles thérapeutiques ?

#### 1. p38 :

Comme nous l'avons expliqué précédemment/dans l'introduction à ces travaux, le rôle de p38 dans la biologie tumorale n'est pas univoque, si tant est qu'il soit totalement cerné. Les modèles les plus poussés à ce jour, reposant sur des invalidations conditionnelles chez la souris, ont essentiellement montré comment p38 intervenait dans la tumorigénèse, en induisant un état différencié des progéniteurs pulmonaires (**Ventura et al., 2007**, Cre-Lox avec expression généralisée de la recombinaison sous tamoxifène) ou en limitant l'impact d'un état d'inflammation chronique dans un modèle de carcinogénèse hépatique (**Sakurai et al., 2008**, Cre-Lox avec Cre dans les macrophages). Dans les deux contextes, l'invalidation de p38 accélère la tumorigénèse induite par un autre signal (Ras ou stress chimique), ce que montrent également les travaux sur Wip1. A l'inverse, les résultats sur les tumeurs sont limités à des résultats sur les lignées, et indiquent des fonctions potentiellement divergentes de p38 :

Ainsi, là où la voie p38 peut être activée lorsque l'on inhibe une série de voies de survie dans des modèles de dépendance aux oncogènes (**Dolado et al., 2007**), à l'inverse, p38 semble être capable de bloquer les cellules déficientes en p53 en cycle suite à l'action d'agents chimiothérapeutiques lésant l'ADN (**Reinhardt et al., 2007**). Dans le second cas, p38 constitue une cible attractive, dont l'inhibition provoquerait une létalité synthétique à l'action de la chimiothérapie. De plus, les inhibiteurs de p38 ont connu un large développement du fait de leur intérêt pour traiter des pathologies à contexte/caractère pro-inflammatoire. Mais il semble que cette utilisation doive être limitée dans le temps (pour éviter une tumorigénèse accrue), et inapplicable dans les thérapies basées sur la dépendance à un oncogène. En outre, bloquer une voie à un niveau relativement bas présente un certain nombre de désavantages (possibilités de voies parallèles, existence de feedbacks- **Engelman, 2009**) qui pourraient en limiter l'efficacité.

## Discussion

---

Nos résultats sur l'implication de la voie p38 dans la mort radioinduite de l'endothélium, même s'ils nécessitent des données complémentaires *in vivo*, montrent combien peut être complexe la définition d'une cible thérapeutique : outre ses différents niveaux d'intervention physiologiques et dans la tumorigénèse (inflammation, différenciation des progéniteurs), son rôle dans les tumeurs établies, notamment en réponse à différents traitements, il faut considérer le rôle propre de p38 dans le microenvironnement, ici représenté par un de ses compartiments, l'endothélium. Nos résultats suggèrent que la localisation du module p38 est cytoplasmique dans l'endothélium, ce qui pourrait distinguer ce dernier des tumeurs où les voies de réponse aux dommages à l'ADN ont *a priori* tendance à le ségréger dans le noyau cellulaire. Dans notre perspective d'engagement de la mort de l'endothélium, préciser la fonction jouée par p38 est particulièrement essentiel, et s'inscrit, de façon plus large, dans la redéfinition systématique du rôle des cibles thérapeutiques dans le microenvironnement tumoral.

### 2. Akt :

A la différence de p38, le statut d'Akt dans les tumeurs est très consensuel. Toutes les données convergent vers une activation de la voie Pi3K/Akt lors de la tumorigénèse, qu'elles soient obtenues dans des modèles cellulaires (**Cheng *et al.*, 1997** ou **Aoki *et al.*, 1998**), murins (**Maroulakou *et al.*, 2007**), ou durant l'analyse des tumeurs humaines (mutations activatrices des RTK, mutations activatrices ou amplifications de la sous-unité catalytique de la Pi3K ou de Akt, inactivation de PTEN, etc. (**Engelman, 2009**)).

Paradoxalement pour une cible aussi reconnue, aucune drogue ciblant la voie n'est, de fait, à l'heure actuelle utilisée en routine, même si de nombreuses molécules sont en phase II de développement clinique, voire en phase IV pour la cible d'Akt, mTor (NCT00567554).

Son application montre que même pour une voie bien établie, il est difficile de parvenir à des approches thérapeutiques :

Les limites rencontrées dans les essais précliniques sont également instructifs : la gamme de tumeurs sensibles aux inhibiteurs de la voie Pi3K/Akt s'est avérée bien plus restreinte que ne le laissent supposer les résultats mécanistiques. Si les inhibiteurs de la voie semblent constituer des bons compléments aux approches ciblant les RTK (inhibiteurs d'EGFR pour les carcinomes pulmonaires, ou d'ERBB2 pour le cancer du sein), en revanche, les résultats ont été beaucoup plus limités en tant qu'agent simple dans des modèles qui semblaient pourtant très sensibles, comme des cancers du sein dans lesquels Pi3K est amplifié (**She *et al.*, 2008**).

Bloquer Akt, du fait de sa position assez en aval dans les voies de transduction, soulève par ailleurs des problèmes similaires à ceux posés par la modulation de p38 : redondance et feedbacks risquent de limiter la portée des interventions.

L'étendue des travaux sur Akt pose également de nouvelles questions sur le degré de ciblage qui doit être réalisé sur la voie. Alors que les rôles spécifiques à chaque isoforme des Pi3K et d'Akt commencent à être distingués, faut-il privilégier l'efficacité thérapeutique avec des inhibiteurs larges, ou au contraire tenter des modulations différentielles et tenter de diminuer ainsi la toxicité du traitement (immunosuppression, intolérance au glucose) ? (**Engelman, 2009**).

Akt constitue donc sans conteste une voie à cibler en contexte tumoral, même si cet objectif est loin d'être aisé à réaliser en pratique.

:

## Discussion

---

Nos résultats montrent qu'un inhibiteur de la voie Akt réverse l'effet protecteur de la S1P. Ce résultat serait particulièrement intéressant dans le cadre de tumeurs produisant un environnement riche en S1P : les approches anti-Akt entreraient alors en synergie entre tumeur et microenvironnement vasculaire. Mais à l'inverse, ce résultat soulève la possibilité d'une toxicité sur la vascularisation saine lors de combinaisons entre stratégies anti-Akt et radiothérapie à forte dose. Toutefois, nos résultats indiquent que le taux de phosphorylation basal de Akt dans la microvasculature intestinale est peu élevé, peut être à nouveau en raison d'une désensibilisation basale de la voie, ce qui laisse espérer une toxicité amoindrie.

# Matériel et méthodes:

---

## I. Cultures cellulaires et traitements :

### 1) Cultures cellulaires

#### 1. Lignée HMEC-1

La lignée HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cells) a été établie dans l'équipe du professeur Caudal, par immortalisation de cellules microvasculaires humaines par l'antigène T du virus SV40, et elle conserve les principales caractéristiques propres aux cellules endothéliales (**Ades et al., 1992**). Ces cellules sont utilisées entre le passage 13 et le passage 20 pour limiter la dérive phénotypique liée à la culture cellulaire. Elles sontensemencées à une densité de 40000 cellules/cm<sup>2</sup>, et cultivées pendant 4 jours, en atmosphère humide, à 37°, enrichie en CO<sub>2</sub> (%), dans un milieu de culture dédié à base de MCDB131 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplémenté avec 15 % de SVF, 10 ng/ml d'EGF (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), 2 µg/ml d'hydrocortisone (Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Favier, France), 2 mM de L-Glutamine (Gibco-BRL, Cergy Pontoise, France) et pénicilline/streptomycine respectivement à 100 U/ml et 100 µg/ml (Sigma-Aldrich).

#### 2. Cellules primaires HMVECs

Les cellules primaires humaines issues de poumon (HMVEC-L, Cambrex, France), sontensemencées à une densité de 10000 cellules/cm<sup>2</sup> en plaques 12 puits, puis cultivées jusqu'à confluence (37°, dans une atmosphère enrichie avec 5% de CO<sub>2</sub>) dans le milieu spécifique développé par le fournisseur (EGM-2MV).

#### 3. Cellules épithéliales

Deux types de cellules épithéliales (don de M.Neunlist, INSERM UMR913) ont été utilisés :

- Les cellules primaires IEC-6. Elles sontensemencées à une densité de 2x10<sup>4</sup> ou 6x10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup> et cultivées en milieu DMEM/ glucose 4.5 g/l (Gibco-BRL).
- La lignée T84. Elle estensemencée à une densité de 2x10<sup>5</sup> cellules/cm<sup>2</sup>, et cultivée en milieu DMEM/F12 (1 :1, Gibco-BRL)

Les deux milieux sont supplémentés avec 10% de SVF décomplémenté, 2 mM de L-glutamine, 100 IU/ml de pénicilline, et 100 µg/ml de streptomycine.

#### 4. Cellules mononucléées du sang périphérique

Les cellules mononucléées du sang périphérique sont isolées par centrifugation sur gradient de densité de ficoll (LMS, Eurobio) à partir de sang frais hépariné, prélevé sur des donneurs sains (ou « atteints d'hémochromatose, donc considérés comme sains »). Les cellules mononucléées du sang périphérique sont ensuite cultivées en milieu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), supplémenté avec 10% de SVF décomplémenté, 1 mM de L-glutamine, 100 IU/ml de pénicilline, et 100 µg/ml de streptomycine, sans IL2.

## Matériel et méthodes

### 2) Traitements :

Toutes les expériences sont réalisées sur des cellules déprivées en sérum (2h ou 18h, 0.1% de sérum et sans EGF pour les cellules HMEC-1, 6h, 0% de sérum pour les cellules HMVEC, 2h et 0.1% de sérum pour les cellules épithéliales).

Les cellules sont traitées par différents inhibiteurs pharmacologiques, différents sphingolipides, puis soumis à différents stress, récapitulés dans les trois tableaux ci-dessous :

#### Inhibiteurs pharmacologiques

Nom de l'inhibiteur	Fabricant	Cible	Concentration	Solvant	Durée du traitement	retrait après traitement
désipramine	Sigma-Aldrich	sphingomyélinase acide	50 $\mu$ M	H <sub>2</sub> O	15'	oui (1h)
glutathion	Sigma-Aldrich	espèces radicalaires	2 $\mu$ M	H <sub>2</sub> O	6h	non
Ly294002	Biomol	Pi3 kinase	1 $\mu$ M	DMSO	3h	non
MAPK III inhibitor	Calbiochem	p38	20 $\mu$ M	DMSO	1h	oui (6h)
monensine	Sigma-Aldrich	sphingomyélinase acide	0,05 $\mu$ M	éthanol	1h	oui (1h)
nystatine	Sigma-Aldrich	cholestérol	2,5 et 5 $\mu$ M	DMSO	1h	oui (1h)
toxine pertussique	Sigma-Aldrich	protéines hétérotrimériques G0 et Gi	1 $\mu$ M	H <sub>2</sub> O	45'	non

#### Sphingolipides

Désignation du traitement	Fabricant	Concentration	Solvant	Durée du traitement
dihydro sphingosine-1-phosphate	Avanti Lipids	1 $\mu$ M	PET (polyéthylène glycol 6000 5%, éthanol 2.5%, Tween 80 0.8%)	2 h
Acide lysophosphatidique	Biomol			
sphingosine-1-phosphate	Biomol			

#### Stress

Désignation du traitement	Machine	Fabricant	Dose	Débit de dose
irradiation	irradiateur à rayons X Faxitron CP160	Faxitron X-ray Corporation	15 Gy	1,48 Gy/minute
Désignation du traitement	Fabricant	Concentration	Solvant	

## Matériel et méthodes

anisomycine	Sigma-Aldrich	4 $\mu$ M	DMSO
céramide	Avanti Lipids	1 $\mu$ M	dodécane:éthanol
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich	5 $\mu$ M	H <sub>2</sub> O
sphingomyélinase bactérienne	Sigma-Aldrich	1 U/mL	PBS: Glycérol

Suivant les expériences, 18 or 2 heures avant irradiation, les cellules sont déprivées en sérum (milieu MCDB 131 supplémenté avec 0.1% FCS, 2 mg/mL d'hydrocortisone, 2 mM de L-glutamine, 100 units/mL de pénicilline, and 100  $\mu$ g/mL de streptomycine).

### 3) Inhibition par RNA interférence

L'invalidation de p38 $\alpha$  a été réalisée en utilisant une approche d'interférence ARN: des duplex d'ARN dirigés contre p38 $\alpha$  ont été insérés dans le plasmid pSUPER (Invitrogen), après digestion par Bgl III et Hind III, puis amplifiés dans les bactéries KL1. La séquence d'ARN ciblée au sein de p38 $\alpha$  était celle de l'équipe Polverini (**Kumar *et al.*, 2004**). Après séquençage, les plasmides pSUPER contenant les duplex de siARN ont été digérés par Xba1 et Xho1, et le fragment excisé a été inséré dans le plasmide lentiviral pFG12 (**Gisstring *et al.*, 1999**), à nouveau amplifié, dans les bactéries XL10. Ce plasmide pFG12 est purifié, puis co-transfecté avec les plasmides pLP1, pLP2 et pLP/VSV-G (Invitrogen), par le CaCl<sub>2</sub>, dans les cellules 293FT. 48 heures après transfection, les surnageants cellulaires ont été récoltés, et les particules virales qu'ils contiennent concentrés 500 fois par ultracentrifugation, avant d'utiliser ces dernières pour infecter de façon stable les cellules HMEC-1. Pour évaluer l'invalidation de p38, l'ARN total des cellules transduites a été extrait selon la méthode de Chomczynski (**Chomczynski et Sacchi, 1987**). Après digestion par la DNase (AmpGrade, Invitrogen), une transcription inverse a été effectuée (M-MLV Reverse Transcriptase, Invitrogen, 1h, 37°). L'extinction du gène ciblé a été ensuite vérifié par PCR classique en utilisant les primers: p38 $\alpha$  for: AACCTGTCTCCAGTGGGCTCT / rev: AGCTTCTTAACTGCCACACG. GAPDH for: GGAGTCAACGGATTTGGTCTCGTA / rev: GGCAACAATATCCACTTTACCAGAGT.

## II. Approches biochimiques :

### 1) Essai DAG kinase

Nous utilisons la technique décrite par Kolesnick (**Dressler et Kolesnic, 1990**) avec des modifications mineures: aux temps désirés, six millions de cellules sont rincées deux fois en PBS, grattées et centrifugées (2500 tpm, 3 minutes), puis les lipides sont extraits par ajout de 2 ml de chloroforme/méthanol/acide chlorhydrique (100:100:1, volume à volume) sur les culots. Les lipides dans la phase inférieure organique sont séchés sous N<sub>2</sub>, puis soumis à une hydrolyse alcaline modérée (KOH et méthanol 0.1M, 1 heure, 37°) pour éliminer les glycérophospholipides. Les extraits sont ensuite soumis à une nouvelle extraction en CHCl<sub>3</sub>/BSS-EDTA (NaCl 135 mM, KCl 4.5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, glucose 5,6 mM, Hepes pH 7,2 10 mM, EDTA 10 mM) puis centrifugés (1500 tpm, 10 minutes). La phase organique est séchée sous N<sub>2</sub>. Le céramide contenu dans chaque fraction est resuspendu dans 100  $\mu$ L d'un mélange réactionnel contenant 150 pg de cardiolipin (Avanti Polar Lipide, Alabaster, AL), 280  $\mu$ M d'acide diéthylènetriaminepentaacétique (DTPA; Sigma-Aldrich), 51



## Matériel et méthodes

---

mM d'octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (Calbiochem, San Diego, CA), 50 mM de NaCl, 51 mM d'imidazole, 1 mM d'EDTA, 12.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de dithiothreitol, 0.7% de glycerol, 70 pM de 13-mercaptoethanol, 1 mM d'ATP, 10 pCi de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3000 Ci/mmol; Dupont New England Nuclear), 35 pg/ml de diacylglycerol kinase d'*Escherichia coli* (Calbiochem), à pH 6.5. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la réaction est stoppée avec 1 ml de chloroforme/méthanol/acide chlorhydrique (100:100:1, v/v/v) and 200  $\mu$ L de BSS-EDTA. La phase organique inférieure est séchée sous N<sub>2</sub>, puis séparée par chromatographie en couche mince sur gel de silice (Whatman, Maidstone, Kent, UK), avec comme solvant un mélange chloroforme/méthanol (1:1, v/v). Enfin, le céramide est détecté par autoradiographie et quantifiés par comparaison à un standard de 62 nmole de céramide C16, en utilisant le programme ImageQuant.

### 2) Activité sphingomyélinase acide

L'activité sphingomyélinase acide a été mesurée par clivage d'un substrat fluorescent, la sphingomyéline-BODIPY. Les cellules HMEC-1 sont récoltées par grattage dans un tampon de lyse acide (250 mM acétate de sodium, 0,2% triton X-100, pH 5.0), puis centrifugés (10000 tpm, 30 min). Les surnageants sont récupérés, puis leur concentration en protéines dosé par test BCA (Interchim), 25, 50 ou 75  $\mu$ g de protéines sont ajoutés à un tampon de réaction acide (acétate de sodium, 250 mM, EDTA, 1 mM, pH 5.0) et à 25  $\mu$ g de sphingomyéline-BODIPY (D7711, Invitrogen, Fluoroprobes), avant incubation d'une heure à 37°C. La réaction est stoppée par addition de chloroforme/méthanol (1/1), incubée 30 min à température ambiante à l'obscurité et centrifugée (2000 tpm, 5 min). La phase organique inférieure est prélevée et évaporée sous azote. Le culot lipidique est alors repris dans du chloroforme. Le céramide-BODIPY formé et la sphingomyéline-BODIPY non consommée sont séparés par chromatographie sur couche mince de silice (Silica Gel 60A, 4860-720, Whatman) dans un tampon chloroforme : méthanol (95 :5). La fluorescence des spots de chacune des deux espèces est détectée par scanner (Typhoon 9410, GE Healthcare, excitation : 503 nm, émission : 512 nm) puis quantifiée par ImageQuant. L'activité mesurée est exprimée en nmol de céramide formé par mg de protéines par heure, puis indicé sur chacun des trois contrôles (**Schissel *et al.*, 1996** et **Marathe *et al.*, 1998**).

### 3) Activité DEVDase

L'activité caspase a été mesurée par clivage d'un substrat fluorescent, comme décrit précédemment (Edelstein *et al.*, 1999). 24h après traitement par la toxine pertussique, la sphingosine-1-phosphate et l'irradiation à 15 Gy, 10<sup>7</sup> cellules ont été lysées dans 100  $\mu$ L de tampon RiPA (NP-40 1%, sodium déoxycholate 0.5%, SDS 0.1%, sodium orthovanadate 2 mM, en PBS). 50  $\mu$ g de protéines ont été diluées dans 32  $\mu$ L de tampon Caspase (Promega) complété avec du DMSO 2%, et du DTT 10 mM. Le mélange réactionnel est préincubé 30 à 37°C avant ajout de 250  $\mu$ M de substrat caspase en Ac-DEVD-AMC dans du DMSO 10%. Le clivage du peptide est mesuré toutes les 15 minutes, pendant 2h, à 25°C, sur un lecteur de plaque (Fluorolite 1000, Dynatech- excitation: 365 nm, émission: 465 nm). L'activité caspase spécifique est exprimée en nmol de peptide clivé par  $\mu$ g de lysat, puis les resultants exprimés en fonction du temps.

### 4) Western Blot

Aux temps de traitement appropriés, les cellules (HMECs ou HMVECs) cultivées à confluence dans des flasques de 80 cm<sup>2</sup> sont rincées en PBS glacé, rapidement congelées dans l'azote liquide puis conservées à -80°. Les cellules sont ensuite lysées par grattage dans le tampon de lyse ((Tris-Hcl 10

## Matériel et méthodes

mM pH 7.5, 150 mM NaCl, NP40 1%, EDTA 5 mM, PMSF 1 mM, orthovanadate de sodium 2 mM, fluoride de sodium 1 mM, leupeptine 0.2  $\mu$ M, aprotinine 0.3  $\mu$ M), puis centrifugées (10000 tpm, 30 min, 4°) pour éliminer les débris membranaires. La concentration protéique des lysats a été déterminée en utilisant le kit BCA (Interchim, France). 80  $\mu$ G (HMECs) ou 20  $\mu$ G (HMVECs) de protéines sont ensuite séparés par SDS-PAGE. Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane (ImmobilonP, Millipore, Billerica, MA). Les membranes sont ensuite bloquées en utilisant le Western Blocking Reagent (Roche- 2h, température ambiante), puis incubées avec l'anticorps primaire (tableau X), sur la nuit (4°), puis avec l'anticorps secondaire (tableau X- 2h, température ambiante), et finalement révélées avec le kit Enhanced Chemoluminescent Development (POD, Roche). Pour être réutilisées/réhybridées, les membranes sont déshybridées par 1 h d'incubation en Western Blot Stripping Reagent (Roche). La membrane est à nouveau saturée et incubée dans un nouvel anticorps primaire.

### Anticorps primaires

Anticorps (cible et référence)	Fabricant	origine	dilution
Actine C-11 (sc-1615)	Santa Cruz Biotechnology	IgG de chèvre	4000e
P-Akt (9271)	Cell Signaling Technology	IgG de lapin	750e
Akt total (9272)	Cell Signaling Technology	polyclonal de lapin	1000e
P-MKK3/6 (9236)	Cell Signaling Technology	IgG de lapin	750e
P-p38 (4631)	Cell Signaling Technology	IgG de lapin	750e
p38 total (9212)	Cell Signaling Technology	polyclonal de lapin	1000e
P-ATF2 (5112)	Cell Signaling Technology	IgG de lapin	1000e

### Anticorps secondaires

Anticorps (cible et référence)	Fabricant	origine	dilution
Anti-chèvre et souris (1500708)	Roche	polyclonal de chèvre	1/1000e (1 mg/ml)
Anti-chèvre (705-035-003)	Jackson	polyclonal de singe	1/4000e (1 mg/ml)

## III. Imagerie

### 1) Coloration

Tous les protocoles d'immunofluorescence ont été réalisés sur des cellules ensemencées 24h auparavant sur lamelles de verre.

#### 1. Marquage de p38:

Après fixation (PFA 3%, 20 minutes, 4°C), les cellules ont été perméabilisées (méthanol, 20 minutes, 4°C) puis bloquées (sérum de chèvre anti-lapin, 0.1%, 1h, 4°C), puis incubées avec l'anticorps primaire (Cell Signaling Technology, IHC preferred phospho-p38 4631 ou p38 total 9212, dilution au 50e ou 100e respectivement, incubation sur la nuit, 4°C), et enfin avec l'anticorps secondaire (anti-lapin conjugué avec la rhodamine, Biosys, Compiègne, France, 200e, 1h, température ambiante).

# Matériel et méthodes

---

## 2. Marquage de la sphingomyélinase acide

Les cellules ont été bloquées (sérum de chèvre anti-lapin 0.1%, 20 minutes, 4°C), puis incubées avec un sérum polyclonal de chèvre dirigé contre la sphingomyélinase acide (don du Dr K.Sandhoff, Université de Bonn, dilution 1/100e, 30 minutes, 4°C) ou un contrôle isotypique (sc-2028) puis, après fixation (PFA 3%, 20 minutes, 4°C), avec l'anticorps secondaire (Sigma-Aldrich, dilution 1/400e, 1h, température ambiante).

## 3. Marquage des radeaux lipidiques

Les cellules sont rincées au PBSF (Phosphate Buffer Solution, Sérum Veau Fétal 1% v/v, azide de sodium 1.5 mM), puis incubées avec 0.1 mM de toxine cholérique (Sigma-Aldrich, 45 min, 4°C), lavées à nouveau en PBSF, et finalement fixées (3% PFA, 30 min., 4°C) (**Grassmé et al., 2002**).

## 4. Détection de la phosphorylation de l'histone H2AX

Ce marquage révèle la présence de cassures double brin de l'ADN. Les cellules sont lavées en PBS et fixées en éthanol 70 % à -20°C sur la nuit. Les cellules sont ensuite réhydratées pendant 10 min ( PBS SVF 4 %, Triton X-100 0,1 %) puis resuspendues dans 200 µl d'AcM IgG1 de souris anti-H2AX humain (clone JBW301; Euromedex; Mundolsheim, France) (dilution 1:500 en PBS SVF 2 %, Triton X-100 0,1 %) pendant 2 h à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées (PBS SVF 2 %, Triton X-100 0,1 %) puis resuspendues dans 100 µl d'Ac secondaire de chèvre anti-souris, fragment IgG F(ab')<sub>2</sub> couplé à la phycoérythrine (Beckman Coulter; Roissy, France) (dilution 1:100 en PBS SVF 2 %, Triton X-100 0,1 %, 1 h, température ambiante. Les cellules sont enfin lavées et reprises dans 20 µg/ml de 7-Amino-Actinomycin D (Sigma-Aldrich).

## 5. Contre-marquage nucléaire:

Les noyaux sont mis en évidence en utilisant le ToproIII (Molecular Probes, Invitrogen, 2 µM, 30', température ambiante) ou une coloration Hoechst (Hoechst 3342, Sigma-Aldrich, 2.5 µg/ml, 10', température ambiante). Les lamelles sont ensuite montées dans le milieu de montage Fluoromount (Southern Biotech, Birmingham, Alabama).

## 2) Acquisition

Les acquisitions sont réalisées avec un microscope à contraste de phase DM (Leica), un microscope à fluorescence Apotome (Zeiss) ou IX71 (Olympus), ou un microscope confocal TCS-SP1 (Leica).

## IV. Approches fonctionnelles

### 1) Survie/apoptose

#### 1. Test de comptage cellulaire

L'indice de cellules apoptotiques est calculé en prenant le ratio entre cellules flottantes et cellules totales (flottantes+adhérentes). La fraction des cellules flottantes représente les cellules flottantes contenues dans le milieu de culture et les cellules faiblement adhérentes obtenues par deux lavages de la monocouche cellulaire avec du PBS-EDTA (Phosphate Buffer Saline). Les cellules adhérentes sont ensuite décollées par action de la trypsine (Sigma-Aldrich). Le nombre de cellules contenu dans les deux fractions est déterminé par comptage sur lame de Malassez (**Lawrence et al., 2001**).

## Matériel et méthodes

### 2. Détection du marqueur apoptotique Apo2.7 :

Le marqueur Apo2.7 (antigène 7A6) est considéré comme un marqueur mitochondrial de l'apoptose (Zhang, 1996). Les cellules adhérentes et flottantes sont récoltées, rincées deux fois en PBS, perméabilisées (digitonine 100 µg/ml, PBS/SVF 2.5%, 20 minutes, 4°C) et marquées avec l'anticorps monoclonal anti-Apo2.7 couplé à la phycoérythrine en suivant le protocole du fabricant (Immunotech, Marseilles, France). Les acquisitions sont réalisées par cytométrie en flux (FACScalibur, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), puis les données analysées en utilisant le programme CellQuest (BD Biosciences).

### 2) Test de clonogénicité sur cellules épithéliales

Les cellules épithéliales sont ensemencées en boîtes de 10 mm à une densité comprise entre  $2.5 \times 10^3$  et  $50 \times 10^3$  cellules/cm<sup>2</sup>. Après deux heures d'incubation en milieu déprivé contenant la S1P ou son solvant, les cellules sont irradiées à une dose totale comprise entre 2 et 15 Gy. Après 24h, et ensuite chaque semaine, les cellules sont replacées en milieu complet. Les cellules sont cultivées deux semaines. Les colonies visibles sont dénombrées après fixation au méthanol (20 minutes), et coloration au crystal violet (1%, 5 minutes).

### 3) Analyse du cycle cellulaire

Les cellules HMEC-1, flottantes et adhérentes, sont récoltées, lavées en PBS, fixées (éthanol 70 %, 20 minutes, -20°C), lavées en PBS puis marquées (iodure de propidium ((Sigma-Aldrich) 40 µg/ml, RNase 100 µg/ml (Qiagen, Courtaboeuf, France), 30 minutes, 37°C, dans l'obscurité). Enfin, les cellules sont lavées puis reprises dans du PBS et analysées au cytomètre en flux FACScalibur® ou FACScan (BD Biosciences). Les résultats sont alors étudiés avec le logiciel CellQuest Pro (BD Biosciences). Les phases du cycle cellulaire sont quantifiées en utilisant le logiciel Flow Jo (Tree Star, Ashland, Oregon, USA).

### 4) Prolifération

La <sup>3</sup>H-Thymidine (1 µCi/ml) est déposée dans le milieu de culture 16 heures après irradiation, et incubées pendant 8h. Les cellules sont alors récoltées puis fixées sur une membrane en fibre de verre (Wallac-PerkinElmer, Courtaboeuf France) à l'aide d'un harvester Titertek Cell (Flow Laboratories, Rickmansworth, RU). La membrane est séchée puis incubée avec du liquide de scintillation Betaplate (Wallac-PerkinElmer). La radioactivité est comptée grâce à un spectromètre de scintillation (Wallac-PerkinElmer), et l'incorporation de 3H-Thymidine est analysée avec le logiciel Microbeta Windows Workstation (Wallac-PerkinElmer).

### 5) Marquage multi-paramétrique des cellules mononucléées

Les cellules mononucléées du sang périphérique (préalablement incubées 2h avec 1 µM de S1P, puis irradiées à 15 Gy), sont récoltées à différents temps suivants l'irradiation ( $5 \times 10^5$  cellules par prélèvement) et marquées conformément aux protocoles des fabricants par divers anticorps couplés à des fluorochromes :

Anticorps ciblant les marqueurs de sous-population :

Anticorps,fluorochrome	Fabricant
Anti-CD3-amcyan ou anti-CD3-Pacific Blue	BD Biosciences
Anti-CD19-APC	eBiosciences
Anti-CD31-APC	eBiosciences

# Matériel et méthodes

Anticorps de détection de l'apoptose :

Anticorps (cible et référence)	Fabricant
Annexine V- FITC	Beckman-Coulter
7-AAD	BD Biosciences

Les analyses de cytométrie en flux sont effectuées avec un FACS Canto II, à l'aide du logiciel FACS Diva6.1 (BD Biosciences).

## V. Modèles murins

### 1) Animaux et traitements

#### 1. Elevage

Les souris C57Bl/6 (Charles River Laboratories, l'Arbresle, France), sont élevées à l'animalerie de l'Unité INSERM U892 (validée par l'AFSTAL, Association Française des Sciences et Techniques de l'Animal de Laboratoire), et les expérimentations sont validées par le comité interrégional d'éthique en expérimentation animale.

Les souris C57Bl/6 x sv129 invalidées pour la sphingomyélinase acide (Horinouchi, 1995, don de R.Kolesnick, Sloane Kettering Memorial Institute, NY) sont élevées en utilisant des couples hétérozygotes. Le génotypage, réalisé par PCR, a lieu entre la 2<sup>e</sup> et la 3<sup>e</sup> semaine, et permet de séparer les souris KO ou sauvages des hétérozygotes reproducteurs.

#### 2. Expérimentations :

Les expérimentations sont réalisées sur des souris âgées de 8 à 12 semaines.

#### ***Irradiations***

Les souris sont soumises à une irradiation corporelle totale par rayons X, à une dose unique de 15 Gy, délivrée à un taux de 1 Gy/min par un irradiateur au <sup>60</sup>Co (Atomic Energy Canada Limited) ou un accélérateur linéaire (General Electric Medical System).

#### ***Traitements par des agents génotoxiques :***

Les animaux sont injectés par voie intra-péritonéale avec :

- 27mg/kg de cisplatine (**Rebillard et al., 2008**)
- 25 mg/kg de doxorubicine (**Hassan et al., 2008**).

Les souris sont sacrifiées 15 min après injection. L'intestin grêle est prélevé et lavé, puis fixé pendant 24h avec une solution de formaldéhyde (10%, Sigma).

#### ***Injection de LPS***

Les souris sont injectées par voie intra-péritonéale avec 175 µg/25 mg de LPS extrait de Salmonella typhimurium (Alexis) dilué en eau stérile.

#### ***Traitements préalables à l'irradiation***

Les souris peuvent être injectées:

## Matériel et méthodes

---

- par voie rétro-orbitale 30 min avant et 5 min après irradiation avec 100 µg/25 mg pour la S1P et la dhS1P, 65 µg/injection pour le LPA (Avanti Lipids; Coger), tous dilués dans le PET, et 10 µg/25 mg d'Akt inhibiteur XI (3-formylchromone thiosemicarbazone, Cu(II)Cl<sub>2</sub>, Calbiochem) dans 0.1 ml d'eau sérielle. Ces doses ont été fixées à des niveaux subléthaux après établissement de la dose maximale tolérée pour chaque sphingolipide et pour l'Akt inhibiteur XI.

- par voie intra-péritonéale 2 h et 30 min avant, 5 min et 2 h après irradiation avec 1 µg/25 mg de toxine pertussique (Sigma-Aldrich), dissoute dans 0.2 ml de HBSS (Hank's balanced salt solution)

### ***Transplantation de moëlle osseuse***

Les souris C57Bl/6 donneuses de moëlle osseuse sont sacrifiées par asphyxie. Les cellules de moëlle osseuse sont récupérées à partir de la cavité médullaire du tibia et du fémur par lavage avec de l'HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) (Sigma-Aldrich) à l'aide d'une aiguille de diamètre 26 (Invitrogen). Les cellules sont ensuite lavées deux fois en HBSS puis resuspendues par passage à travers une aiguille de diamètre 21. Après comptage, les cellules sont diluées à  $5 \times 10^6$  cellules pour 200 µl, puis injectées dans la veine de la queue de la souris receveuse 16 h après irradiation corporelle totale.

## 2) Immunohistochimie

### 1. Préparation des tissus

Les souris sont sacrifiées par asphyxie, et différents organes collectés: des segments de 2,5 cm du jejunum proximal, ainsi que la tête et la partie proximale du fémur sont récupérés. Les échantillons d'intestin sont fixés par incubation sur la nuit en formaldéhyde 4 % PBS, tandis que les échantillons osseux sont fixés en decalcifer II (Surgipath, Peterborough, Angleterre). Les tissus fixés sont inclus dans des blocs de paraffine, et des sections de 5 µm d'organes sont réalisées à l'aide d'un ultramicrotome. Elles sont ensuite étalées sur lames de verre traitées à la polylysine. Les sections sont déparaffinées par traitement à la chaleur (90°C, 10 min puis 60°C, 5 min) avant d'être lavées deux fois en xylène.

### 2. Marquages

Les lames sont enfin marquées :

#### ***Marquage hématoxyline***

Les lames sont réhydratées par des bains successifs en éthanol (100 % 15 min, 70 % 15 min) puis rincées 10 min à l'eau distillée. Elles sont ensuite marquées 45 s en hématoxyline (Marck Europium, Paris, France) puis rincées abondamment à l'eau distillée.

#### ***Marquage éosine***

Un bain de 3 s en acide acétique précède le marquage de 30 s en éosine (Sigma-Aldrich). Les lames sont rincées en eau distillée puis en éthanol (70 % 1 min 30 s, 100 % 1 min 30 s) puis déshydratées par deux bains successifs de 2 min en xylène.

#### ***Marquage TUNEL***

## Matériel et méthodes

---

Le marquage TUNEL est effectué sur des coupes d'intestin 4h après irradiation, en utilisant alternativement un marquage FITC ou peroxydase (Roche), conformément au protocole du fabricant. Les cellules apoptotiques sont identifiées par un marquage nucléaire TUNEL positif rouge-brun (**Paris et al., 2001a**).

### **Marquage p38 phosphorylé**

Les échantillons sont exposés à une solution de déparaffinage (Menarini), déshydratés par l'éthanol, puis subissent un démasquage antigénique en tampon citrate pH6 (Menarini), avant lavages puis neutralisation des peroxydases endogènes par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Menarini). Après marquage par l'anticorps primaire (4631, CST, au 150<sup>e</sup>, 30 minutes), puis secondaire (anti souris 414151F, MICROM, 30 minutes), la révélation se fait par exposition au DAB (Menarini, 10 minutes), suivie d'une contre-coloration à l'hématoxyline (Ménarini, 1 minute) et du montage sur lamelle. Les marquages sont réalisés sur l'automate Bond MAX (Menarini).

### **Marquages CD31 et Akt :**

Les tissus fixés sont perméabilisés au méthanol (20 minutes, 4°), puis subissent un démasquage antigénique (chauffage micro-onde dans une solution citrate 0.1N). Après lavages en PBS froid, les tissus sont incubés avec l'anticorps primaire ciblant le phospho-Akt (3787, Cell Signaling Technologies, 1/50<sup>e</sup>) ou le CD31 (MEC13.3 couplé à la rhodamine ou au FITC, Becton Dickinson, 200<sup>e</sup>) sur la nuit, à 4°. L'anticorps ciblant le phospho Akt est révélé par un anticorps secondaire (chèvre anti-lapin couplé à la rhodamine, BioSys, 200<sup>e</sup>, 1 heure, température ambiante). Après contre-marquage nucléaire (DAPI, Sigma-Aldrich, 10 minutes, température ambiante), les lames sont montées en Fluoromount (Southern Biotech).

### **Dénombrement des cryptes**

Le dénombrement est effectué selon la méthode établie par Withers et Elkind (**Withers et Elkind, 1970**). Les échantillons d'intestin grêle sont récoltés 3.5 jours après irradiation et colorés à l'hématoxyline/éosine comme décrit précédemment. Les cryptes survivantes sont définies comme contenant au moins 10 cellules chromophiliques (qui ne soient pas des cellules de Paneth), ou une cellule de Paneth, et possédant une lumière définie. La circonférence d'une section transversale sert d'unité de référence, et le nombre de cryptes survivantes est dénombré dans chaque circonférence. Chaque point est le résultat d'un dénombrement effectué pour 10 cryptes dans 4 souris différentes (**Paris et al., 2001a**).

Pour établir l'histogramme de la fréquence des événements apoptotiques dans la lamina propria, des portions d'intestin grêle marquées par TUNEL sont étudiées : on dénombre les cellules apoptotiques dans la lamina propria de 400 cryptes par point, sur trois expériences différentes.

### **Comptage des leucocytes**

Le sang périphérique des souris, éventuellement traitées à la S1P, et irradiées, est prélevé quotidiennement au niveau rétro-orbital, et stocké dans des microtubes coatés en EDTA (Melet Schloesig). La leucopénie radioinduite est mesurée par un hémocytomètre (Melet Schloesig).

### **Mesure du TNF sérique**

Le sang périphérique des souris est prélevé au niveau rétro-orbital, 1.5h après traitements par la S1P et le LPS, et le TNF quantifié par ELISA (Biosource) conformément aux instructions du fabricant.

## Matériel et méthodes

---

### 3. Acquisition

Les lames sont observées sur un microscope Axiovert (Carl Zeiss Inc., avec objectifs 20X (apochromat) ou 63X (plan-apochrome). L'acquisition se fait par le logiciel Axiovision et une caméra AxioCam (Carl Zeiss Inc.).

### 3) Survie des souris et évaluation des causes de la mort

Les souris agonales, montrant des signes de syndrome gastro-intestinal tels que des diarrhées, un amaigrissement, ou des difficultés de locomotion, ou les souris contrôles, sont sacrifiées par asphyxie. Les échantillons obtenus à partir des organes sont fixés en formaldéhyde et marqués par hématoxyline/éosine comme décrit précédemment. Les dommages gastro-intestinaux sont diagnostiqués comme étant la cause de la mort quand les intestins montrent une muqueuse dénudée sans villosités ni cryptes apparentes. Les dommages de la moelle osseuse sont diagnostiqués comme étant la cause de la mort quand la moelle présente une déplétion complète en éléments hématopoïétiques (**Paris et al., 2001a**). Les courbes de survie sont réalisées selon la méthode de Kaplan-Meier, et les différences statistiques établies par le test de Mantel-Cox.



# Références bibliographiques

---

- Abraham, R. T. (2005). MAPKAP kinase-2: three's company at the G(2) checkpoint. *Molecular Cell*, 17(2), 163-164.
- Abramsson, A., Lindblom, P., et Betsholtz, C. (2003). Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(8), 1142-1151.
- Adams, R. H., Porras, A., Alonso, G., Jones, M., Vintersten, K., Panelli, S., Valladares A, Perez L, Klein R, Nebreda AR. (2000). Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Molecular Cell*, 6(1), 109-116.
- Adams, R. H., et Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(6), 464-478.
- Ades, E. W., Candal, F. J., Swerlick, R. A., George, V. G., Summers, S., Bosse D., Lawley TJ. (1992). HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *The Journal of Investigative Dermatology*, 99(6), 683-690.
- Aguirre-Ghiso, J. A., Ossowski, L., et Rosenbaum, S. K. (2004). Green fluorescent protein tagging of extracellular signal-regulated kinase and p38 pathways reveals novel dynamics of pathway activation during primary and metastatic growth. *Cancer Research*, 64(20), 7336-7345.
- Ali, M. R., Cheng, K. H., et Huang, J. (2006). Ceramide drives cholesterol out of the ordered lipid bilayer phase into the crystal phase in 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine/cholesterol/ceramide ternary mixtures. *Biochemistry*, 45(41), 12629-12638.
- Alon, T., Hemo, I., Itin, A., Pe'er, J., Stone, J., et Keshet, E. (1995). Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature Medicine*, 1(10), 1024-1028.

## Références bibliographiques

---

- Ameisen, J. C. (2002). On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death and Differentiation*, 9(4), 367-393.
- Ancellin, N., et Hla, T. (1999). Differential pharmacological properties and signal transduction of the sphingosine 1-phosphate receptors EDG-1, EDG-3, and EDG-5. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(27), 18997-19002.
- Ancellin, N., Colmont, C., Su, J., Li, Q., Mittereder, N., Chae, S., Stefansson S, Liau G, Hla T. (2002). Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(8), 6667-6675
- Anderson, R. G. W., et Jacobson, K. (2002). A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5574), 1821-1825.
- Andrieu-Abadie, N., Jaffrezou, J. P., Hatem, S., Laurent, G., Levade, T., et Mercadier, J. J. (1999). L-carnitine prevents doxorubicin-induced apoptosis of cardiac myocytes: role of inhibition of ceramide generation. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(12), 1501-1510.
- Aoki, M., Batista, O., Bellacosa, A., Tschlis, P., et Vogt, P. K. (1998). The akt kinase: molecular determinants of oncogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 14950-14955.
- Aoki, S., Yatomi, Y., Ohta, M., Osada, M., Kazama, F., Satoh, K., Nakahara K, Ozaki Y. (2005). Sphingosine 1-phosphate-related metabolism in the blood vessel. *Journal of Biochemistry*, 138(1), 47-55.
- Arbeit, J. M., Olson, D. C., et Hanahan, D. (1996). Upregulation of fibroblast growth factors and their receptors during multi-stage epidermal carcinogenesis in K14-HPV16 transgenic mice. *Oncogene*, 13(9), 1847-1857.
- Arbiser, J. L. (2007). Why targeted therapy hasn't worked in advanced cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(10), 2762-2765.

## Références bibliographiques

---

- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5302), 964-967.
- Bacus, S. S., Gudkov, A. V., Lowe, M., Lyass, L., Yung, Y., Komarov, A. P., Keyomarsi K, Yarden Y, Seger R. (2001). Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53. *Oncogene*, 20(2), 147-155.
- Bai, J., et Pagano, R. E. (1997). Measurement of spontaneous transfer and transbilayer movement of BODIPY-labeled lipids in lipid vesicles. *Biochemistry*, 36(29), 8840-8848.
- Baluk, P., Morikawa, S., Haskell, A., Mancuso, M., et McDonald, D. M. (2003). Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *The American Journal of Pathology*, 163(5), 1801-1815.
- Baran, Y., Salas, A., Senkal, C. E., Gunduz, U., Bielawski, J., Obeid, L. M., et 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(15), 10922-10934.
- Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, 449(7165), 1003-1007.
- Barroso, M. P., Gómez-Díaz, C., Villalba, J. M., Burón, M. I., López-Lluch, G., et Navas, P. (1997). Plasma membrane ubiquinone controls ceramide production and prevents cell death induced by serum withdrawal. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 29(3), 259-267.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou LV, Kolettas E, Niforou K, Zoumpourlis VC, Takaoka M, Nakagawa H, Tort F, Fugger K, Johansson F, Sehested M, Andersen CL, Dyrskjot L, Ørntoft T, Lukas J, Kittas C, Helleday T, Halazonetis TD, Bartek J, Gorgoulis VG (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, 444(7119), 633-637.

## Références bibliographiques

---

- Bartlett, J. B., Dredge, K., et Dalglish, A. G. (2004). The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nature Reviews. Cancer*, 4(4), 314-322.
- Bassi, R., Anelli, V., Giussani, P., Tettamanti, G., Viani, P., et Riboni, L. (2006). Sphingosine-1-phosphate is released by cerebellar astrocytes in response to bFGF and induces astrocyte proliferation through Gi-protein-coupled receptors. *Glia*, 53(6), 621-630.
- Batchelor, T. T., Sorensen, A. G., di Tomaso, E., Zhang, W., Duda, D. G., Cohen, K. S., Kozak KR, Cahill DP, Chen PJ, Zhu M, Ancukiewicz M, Mrugala MM, Plotkin S, Drappatz J, Louis DN, Ivy P, Scadden DT, Benner T, Loeffler JS, Wen PY, Jain RK. (2007). AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell*, 11(1), 83-95.
- Baumann, N. A., Sullivan, D. P., Ohvo-Rekilä, H., Simonot, C., Pottekat, A., Klaassen, Z., Beh CT, Menon AK. (2005). Transport of newly synthesized sterol to the sterol-enriched plasma membrane occurs via nonvesicular equilibration. *Biochemistry*, 44(15), 5816-5826.
- Bayerl, M. G., Bruggeman, R. D., Conroy, E. J., Hengst, J. A., King, T. S., Jimenez, M., Claxton DF, Yun JK. (2008). Sphingosine kinase 1 protein and mRNA are overexpressed in non-Hodgkin lymphomas and are attractive targets for novel pharmacological interventions. *Leukemia et Lymphoma*, 49(5), 948-954.
- Bellon, S., Fitzgibbon, M. J., Fox, T., Hsiao, H. M., et Wilson, K. P. (1999). The structure of phosphorylated p38gamma is monomeric and reveals a conserved activation-loop conformation. *Structure (London, England: 1993)*, 7(9), 1057-1065.
- Benjamin, L. E., Hemo, I., et Keshet, E. (1998). A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development (Cambridge, England)*, 125(9), 1591-1598.
- Ben-Levy, R., Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H. F., et Marshall, C. J. (1998). Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Current Biology: CB*, 8(19), 1049-1057.
- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biology*, 2(10), 737-744.

## Références bibliographiques

---

- Bergers, G., et Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews. Cancer*, 3(6), 401-410.
- Bergers, G., et Hanahan, D. (2008). Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 8(8), 592-603.
- Bernardo, K., Hurwitz, R., Zenk, T., Desnick, R. J., Ferlinz, K., Schuchman, E. H., et Sandhoff K. (1995). Purification, characterization, and biosynthesis of human acid ceramidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(19), 11098-11102.
- Bernier, J., Hall, E. J., et Giaccia, A. (2004). Radiation oncology: a century of achievements. *Nature Reviews. Cancer*, 4(9), 737-747.
- Betsholtz, C. (2004). Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine et Growth Factor Reviews*, 15(4), 215-228
- Bezombes, C., Grazide, S., Garret, C., Fabre, C., Quillet-Mary, A., Müller, S., Jaffrézou JP, Laurent G. (2004). Rituximab antiproliferative effect in B-lymphoma cells is associated with acid-sphingomyelinase activation in raft microdomains. *Blood*, 104(4), 1166-1173.
- Bionda, C., Hadchity, E., Alphonse, G., Chapet, O., Rousson, R., Rodriguez-Lafrasse, C., et Ardail D. (2007). Radioresistance of human carcinoma cells is correlated to a defect in raft membrane clustering. *Free Radical Biology et Medicine*, 43(5), 681-694.
- Bock, J., et Gulbins, E. (2003). The transmembranous domain of CD40 determines CD40 partitioning into lipid rafts. *FEBS Letters*, 534(1-3), 169-174.
- Boehm, T., Folkman, J., Browder, T., et O'Reilly, M. S. (1997). Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*, 390(6658), 404-407.
- Bonhoure, E., Pchejetski, D., Aouali, N., Morjani, H., Levade, T., Kohama, T., et Cuvillier O. (2006). Overcoming MDR-associated chemoresistance in HL-60 acute myeloid leukemia cells by targeting sphingosine kinase-1. *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 20(1), 95-102.
- Bonnaud, S., Niaudet, C., Pottier, G., Gaugler, M., Millour, J., Barbet, J., Sabatier L. et Paris F. (2007). Sphingosine-1-phosphate protects proliferating endothelial cells from ceramide-induced apoptosis but not from DNA damage-induced mitotic death. *Cancer Research*, 67(4), 1803-1811.

## Références bibliographiques

---

- Bose, R., Verheij, M., Haimovitz-Friedman, A., Scotto, K., Fuks, Z., et Kolesnick, R. (1995). Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell*, 82(3), 405-414.
- Bouzin, C., et Feron, O. (2007). Targeting tumor stroma and exploiting mature tumor vasculature to improve anti-cancer drug delivery. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 10(3), 109-120.
- Bradham, C., et McClay, D. R. (2006). p38 MAPK in development and cancer. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 5(8), 824-828.
- Brady, R. O., Kanfer, J. N., Mock, M. B., et Fredrickson, D. S. (1966). The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 55(2), 366-369.
- Brancho, D., Tanaka, N., Jaeschke, A., Ventura, J., Kelkar, N., Tanaka, Y., Kyuuma M, Takeshita T, Flavell RA, Davis RJ. (2003). Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes et Development*, 17(16), 1969-1978.
- Brem, S., Brem, H., Folkman, J., Finkelstein, D., et Patz, A. (1976). Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous. *Cancer Research*, 36(8), 2807-2812.
- Bretscher, M. S. (1973). Membrane structure: some general principles. *Science (New York, N.Y.)*, 181(100), 622-629.
- Browder, T., Butterfield, C. E., Kräling, B. M., Shi, B., Marshall, B., O'Reilly, M. S., et Folkman J. (2000). Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Research*, 60(7), 1878-1886.
- Brown, D. A., et London, E. (1998a). Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *The Journal of Membrane Biology*, 164(2), 103-114.
- Brown, D. A., et Rose, J. K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68(3), 533-544.
- Brown, R. E. (1998). Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal. *Journal of Cell Science*, 111 ( Pt 1), 1-9.

## Références bibliographiques

---

- Brunet, A., Roux, D., Lenormand, P., Dowd, S., Keyse, S., et Pouyssegur, J. (1999). Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *The EMBO Journal*, *18*(3), 664-674.
- Bucci, M. K., Bevan, A., et Roach, M. (2005). Advances in radiation therapy: conventional to 3D, to IMRT, to 4D, and beyond. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *55*(2), 117-134.
- Bulavin, D. V., Saito, S., Hollander, M. C., Sakaguchi, K., Anderson, C. W., Appella, E., et Fornace AC Jr. (1999). Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *The EMBO Journal*, *18*(23), 6845-6854.
- Bulavin, D. V., Demidov, O. N., Saito, S., Kauraniemi, P., Phillips, C., Amundson, S. A., Ambrosino C, Sauter G, Nebreda AR, Anderson CW, Kallioniemi A, Fornace AJ Jr, Appella E. (2002). Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. *Nature Genetics*, *31*(2), 210-215.
- Bulavin, D. V., Kovalsky, O., Hollander, M. C., et Fornace, A. J. (2003). Loss of oncogenic H-ras-induced cell cycle arrest and p38 mitogen-activated protein kinase activation by disruption of Gadd45a. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(11), 3859-3871.
- Bulavin, D. V., Phillips, C., Nannenga, B., Timofeev, O., Donehower, L. A., Anderson, C. W., Appella E, Fornace AJ Jr. (2004). Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nature Genetics*, *36*(4), 343-350.
- Burrows, F. J., et Thorpe, P. E. (1993). Eradication of large solid tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(19), 8996-9000.
- Burrows, F. J., Watanabe, Y., et Thorpe, P. E. (1992). A murine model for antibody-directed targeting of vascular endothelial cells in solid tumors. *Cancer Research*, *52*(21), 5954-5962.
- Bussolino, F., Di Renzo, M. F., Ziche, M., Bocchietto, E., Olivero, M., Naldini, L., Gaudino G, Tamagnone L, Coffe A, Comoglio PM. (1992). Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *The Journal of Cell Biology*, *119*(3), 629-641.
- Burton, A. (2002). What went wrong with Iressa? *The Lancet Oncology*, *3*(12), 708.
- Camerer, E., Regard, J. B., Cornelissen, I., Srinivasan, Y., Duong, D. N., Palmer, D., Pham TH, Wong JS, Pappu R, Coughlin SR. (2009). Sphingosine-1-phosphate in the plasma compartment regulates basal

## Références bibliographiques

---

and inflammation-induced vascular leak in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(7), 1871-1879.

Cano, E., Hazzalin, C. A., et Mahadevan, L. C. (1994). Anisomycin-activated protein kinases p45 and p55 but not mitogen-activated protein kinases ERK-1 and -2 are implicated in the induction of c-fos and c-jun. *Molecular and Cellular Biology*, 14(11), 7352-7362.

Cao, Y. (2001). Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *The International Journal of Biochemistry et Cell Biology*, 33(4), 357-369.

Cao, Y., Cao, R., et Hedlund, E. (2008). R Regulation of tumor angiogenesis and metastasis by FGF and PDGF signaling pathways. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 86(7), 785-789.

Capdeville, R., Buchdunger, E., Zimmermann, J., et Matter, A. (2002). Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 1(7), 493-502.

Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J. M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. (1998). Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, 394(6692), 485-490.

Carmeliet, P., et Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249-257.

Carmeliet, P., Mackman, N., Moons, L., Luther, T., Gressens, P., Van Vlaenderen, I., Demunck H, Kasper M, Breier G, Evrard P, Müller M, Risau W, Edgington T, Collen D. (1996). Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature*, 383(6595), 73-75.

Carmeliet, P., et Tessier-Lavigne, M. (2005). Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature*, 436(7048), 193-200.

Casanovas, O., Miró, F., Estanyol, J. M., Itarte, E., Agell, N., et Bachs, O. (2000). Osmotic stress regulates the stability of cyclin D1 in a p38SAPK2-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(45), 35091-35097.

Casanovas, O., Hicklin, D. J., Bergers, G., et Hanahan, D. (2005). Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell*, 8(4), 299-309.



## Références bibliographiques

---

- Chabner, B. A., et Roberts, T. G. (2005). Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 5(1), 65-72.
- Chae, S., Paik, J., Furneaux, H., et Hla, T. (2004). Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(8), 1082-1089.
- Chae, S., Proia, R. L., et Hla, T. (2004). Constitutive expression of the S1P1 receptor in adult tissues. *Prostaglandins et Other Lipid Mediators*, 73(1-2), 141-150.
- Chalfant, C. E., Kishikawa, K., Mumby, M. C., Kamibayashi, C., Bielawska, A., et Hannun, Y. A. (1999). Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(29), 20313-20317.
- Chambers, R. C., Leoni, P., Kaminski, N., Laurent, G. J., et Heller, R. A. (2003). Global expression profiling of fibroblast responses to transforming growth factor-beta1 reveals the induction of inhibitor of differentiation-1 and provides evidence of smooth muscle cell phenotypic switching. *The American Journal of Pathology*, 162(2), 533-546.
- Ch'ang, H., Maj, J. G., Paris, F., Xing, H. R., Zhang, J., Truman, J., Cardon-Cardo C, Haimovitz-Friedman A, et Kolesnick R, Fuks Z. (2005). ATM regulates target switching to escalating doses of radiation in the intestines. *Nature Medicine*, 11(5), 484-490.
- Charruyer, A., Grazide, S., Bezombes, C., Müller, S., Laurent, G., et Jaffrézou, J. (2005). UV-C light induces raft-associated acid sphingomyelinase and JNK activation and translocation independently on a nuclear signal. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(19), 19196-19204.
- Chatterjee, M., et Wu, S. (2001). Involvement of Fas receptor and not tumor necrosis factor-alpha receptor in ultraviolet-induced activation of acid sphingomyelinase. *Molecular Carcinogenesis*, 30(1), 47-55.
- Chen, J., Fujii, K., Zhang, L., Roberts, T., et Fu, H. (2001). Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal-regulating kinase 1 through a MEK-ERK independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14), 7783-7788.
- Chen, R. H., Sarnecki, C., et Blenis, J. (1992). Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Molecular and Cellular Biology*, 12(3), 915-927.

## Références bibliographiques

---

- Cheng, J. Q., Altomare, D. A., Klein, M. A., Lee, W. C., Kruh, G. D., Lissy, N. A., et Testa JR. (1997). Transforming activity and mitosis-related expression of the AKT2 oncogene: evidence suggesting a link between cell cycle regulation and oncogenesis. *Oncogene*, *14*(23).
- Chiang, E. Y., Hidalgo, A., Chang, J., et Frenette, P. S. (2007). Imaging receptor microdomains on leukocyte subsets in live mice. *Nature Methods*, *4*(3), 219-222.
- Chiantia, S., Kahya, N., et Schwille, P. (2007). Raft domain reorganization driven by short- and long-chain ceramide: a combined AFM and FCS study. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, *23*(14), 7659-7665.
- Cho, C., Kammerer, R. A., Lee, H. J., Steinmetz, M. O., Ryu, Y. S., Lee, S. H., Yasunaga K, Kim KT, Kim I, Choi HH, Kim W, Kim SH, Park SK, Lee GM, Koh GY. (2004). COMP-Ang1: a designed angiopoietin-1 variant with nonleaky angiogenic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(15), 5547-5552
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, *162*(1), 156-159.
- Christofori, G., Naik, P., et Hanahan, D. (1995). Vascular endothelial growth factor and its receptors, flt-1 and flk-1, are expressed in normal pancreatic islets and throughout islet cell tumorigenesis. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *9*(12), 1760-1770.
- Christophorou, M. A., Martin-Zanca, D., Soucek, L., Lawlor, E. R., Brown-Swigart, L., Verschuren, E. W., et Evan GI. (2005). Temporal dissection of p53 function in vitro and in vivo. *Nature Genetics*, *37*(7), 718-726.
- Ciarrocchi, A., Jankovic, V., Shaked, Y., Nolan, D. J., Mittal, V., Kerbel, R. S., Nimer SD, Benezra R. (2007). Id1 restrains p21 expression to control endothelial progenitor cell formation. *PLoS ONE*, *2*(12), e1338.
- Cifone, M. G., De Maria, R., Roncaioli, P., Rippon, M. R., Azuma, M., Lanier, L. L., Santoni A, Testi R. (1994). Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. *The Journal of Experimental Medicine*, *180*(4), 1547-1552.
- Cifone, M. G., Roncaioli, P., De Maria, R., Camarda, G., Santoni, A., Ruberti, G., et Testi R. (1995). Multiple pathways originate at the Fas/APO-1 (CD95) receptor: sequential involvement of

## Références bibliographiques

---

phosphatidylcholine-specific phospholipase C and acidic sphingomyelinase in the propagation of the apoptotic signal. *The EMBO Journal*, 14(23), 5859-5868.

Clarke, A. R. (2008). Puma: mauling the intestinal crypt. *Cell Stem Cell*, 2(6), 517-518.

Clarke, C. J., et Hannun, Y. A. (2006). Neutral sphingomyelinases and nSMase2: bridging the gaps. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1758(12), 1893-1901.

Clerk, A., et Sugden, P. H. (2006). Inflammation my heart (by p38-MAPK). *Circulation Research*, 99(5), 455-458.

Connolly, D. T., Heuvelman, D. M., Nelson, R., Olander, J. V., Eppley, B. L., Delfino, J. J., Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J. (1989). Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 84(5), 1470-1478.

Cory, S., et Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews. Cancer*, 2(9), 647-656.

Coste, H., Martel, M. B., et Got, R. (1986). Topology of glucosylceramide synthesis in Golgi membranes from porcine submaxillary glands. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 858(1), 6-12.

Coultas, L., Chawengsaksophak, K., et Rossant, J. (2005). Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature*, 438(7070), 937-945.

Cremesti, A., Paris, F., Grassmé, H., Holler, N., Tschopp, J., Fuks, Z., Gulbins E, Kolesnick R. (2001). Ceramide enables fas to cap and kill. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 23954-23961.

Cremesti, A. E., Goni, F. M., et Kolesnick, R. (2002). Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome? *FEBS Letters*, 531(1), 47-53.

Cuadras, M. A., et Greenberg, H. B. (2003). Rotavirus infectious particles use lipid rafts during replication for transport to the cell surface in vitro and in vivo. *Virology*, 313(1), 308-321.

Cuenda, A., et Rousseau, S. (2007). p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1773(8), 1358-1375.

Curnis, F., Sacchi, A., et Corti, A. (2002). Improving chemotherapeutic drug penetration in tumors by vascular targeting and barrier alteration. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(4), 475-482.

## Références bibliographiques

---

- Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, S., et Spiegel S. (1996). Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 381(6585)
- Cuvillier, O., Rosenthal, D. S., Smulson, M. E., et Spiegel, S. (1998). Sphingosine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose) polymerase and lamins during Fas- and ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(5), 2910-2916.
- D'Amato, R. J., Loughnan, M. S., Flynn, E., et Folkman, J. (1994). Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(9), 4082-4085.
- Dameron, K. M., Volpert, O. V., Tainsky, M. A., et Bouck, N. (1994). Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5178), 1582-1584.
- Date, I., Takagi, N., Takagi, K., Kago, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., et Takeo S. (2004). Hepatocyte growth factor attenuates cerebral ischemia-induced learning dysfunction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319(4), 1152-1158.
- Daub, H., Olsen, J. V., Bairlein, M., Gnad, F., Oppermann, F. S., Körner, R., Greff Z, Kéri G, Stemmann O, Mann M. (2008). Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle. *Molecular Cell*, 31(3), 438-448.
- Davis, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 103(2), 239-252.
- Deacon, K., Mistry, P., Chernoff, J., Blank, J. L., et Patel, R. (2003). p38 Mitogen-activated protein kinase mediates cell death and p21-activated kinase mediates cell survival during chemotherapeutic drug-induced mitotic arrest. *Molecular Biology of the Cell*, 14(5), 2071-2087.
- DeGrella, R. F., et Simoni, R. D. (1982). Intracellular transport of cholesterol to the plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(23), 14256-14262.
- Del Gaizo Moore, V., et Letai, A. (2008). Rational design of therapeutics targeting the BCL-2 family: are some cancer cells primed for death but waiting for a final push? *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 615, 159-175.
- Dephoure, N., Zhou, C., Villén, J., Beausoleil, S. A., Bakalarski, C. E., Elledge, S. J., et Gygi SP. (2008). A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(31), 10762-10767.

## Références bibliographiques

---

- Dérijard, B., Hibi, M., Wu, I. H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin M, Davis RJ. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*, 76(6), 1025-1037.
- Dérijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I. H., Han, J., Ulevitch, R. J., et Davis RJ. (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science (New York, N.Y.)*, 267(5198), 682-685.
- Diehl, N. L., Enslin, H., Fortner, K. A., Merritt, C., Stetson, N., Charland, C., Flavell RA, Davis RJ, Rincón M. (2000). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway arrests cell cycle progression and differentiation of immature thymocytes in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 191(2), 321-334.
- Dietrich, C., Volovyk, Z. N., Levi, M., Thompson, N. L., et Jacobson, K. (2001). Partitioning of Thy-1, GM1, and cross-linked phospholipid analogs into lipid rafts reconstituted in supported model membrane monolayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10642-10647.
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra C, Garre' M, Nuciforo PG, Bensimon A, Maestro R, Pelicci PG, d'Adda di Fagagna F. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*, 444(7119), 638-642.
- Dobrowsky, R. T., et Hannun, Y. A. (1992). Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(8), 5048-5051.
- Dobrowsky, R. T., Kamibayashi, C., Mumby, M. C., et Hannun, Y. A. (1993). Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(21), 15523-15530.
- Dolado, I., Swat, A., Ajenjo, N., De Vita, G., Cuadrado, A., et Nebreda, A. R. (2007). p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell*, 11(2), 191-205.
- Dredge, K., Marriott, J. B., Macdonald, C. D., Man, H., Chen, R., Muller, G. W., Stirling D, Dalgleish AG. (2002). Novel thalidomide analogues display anti-angiogenic activity independently of immunomodulatory effects. *British Journal of Cancer*, 87(10), 1166-1172.

## Références bibliographiques

---

- Dressler, K. A., & Kolesnick, R. N. (1990). Ceramide 1-phosphate, a novel phospholipid in human leukemia (HL-60) cells. Synthesis via ceramide from sphingomyelin. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(25), 14917-14921.
- Dressler, K. A., Mathias, S., et Kolesnick, R. N. (1992). Tumor necrosis factor-alpha activates the sphingomyelin signal transduction pathway in a cell-free system. *Science (New York, N.Y.)*, 255(5052), 1715-1718.
- Dropulić, B., et Masters, C. L. (1987). Culture of mouse brain capillary endothelial cell lines that express factor VIII, gamma-glutamyl transpeptidase, and form junctional complexes in vitro. *In Vitro Cellular et Developmental Biology: Journal of the Tissue Culture Association*, 23(11), 775-781.
- Dumitru, C. A., et Gulbins, E. (2006). TRAIL activates acid sphingomyelinase via a redox mechanism and releases ceramide to trigger apoptosis. *Oncogene*, 25(41), 5612-5625
- Dumitru, C. A., Carpinteiro, A., Trarbach, T., Hengge, U. R., et Gulbins, E. (2007). Doxorubicin enhances TRAIL-induced cell death via ceramide-enriched membrane platforms. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 12(8), 1533-1541.
- Eberhard, A., Kahlert, S., Goede, V., Hemmerlein, B., Plate, K. H., et Augustin, H. G. (2000). Heterogeneity of Angiogenesis and Blood Vessel Maturation in Human Tumors: Implications for Antiangiogenic Tumor Therapies. *Cancer Res*, 60(5), 1388-1393.
- Edidin, M. (2003a). Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(5), 414-418.
- Edidin, M. (2003b). The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 32, 257-283.
- Edsall, L. C., Pirianov, G. G., et Spiegel, S. (1997). Involvement of sphingosine 1-phosphate in nerve growth factor-mediated neuronal survival and differentiation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(18), 6952-6960.
- Edwards, S. L., Brough, R., Lord, C. J., Natrajan, R., Vatcheva, R., Levine, D. A., Boyd J, Reis-Filho JS, Ashworth A. (2008). Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. *Nature*, 451(7182), 1111-1115.

## Références bibliographiques

---

- Eguchi, R., Suzuki, A., Miyakaze, S., Kaji, K., et Ohta, T. (2007). Hypoxia induces apoptosis of HUVECs in an in vitro capillary model by activating proapoptotic signal p38 through suppression of ERK1/2. *Cellular Signalling*, 19(6), 1121-1131.
- Eliou, E. A. (2001). The Ste5p scaffold. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 22), 3967-3978.
- Eliyahu, E., Park, J., Shtraizent, N., He, X., et Schuchman, E. H. (2007). Acid ceramidase is a novel factor required for early embryo survival. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(7), 1403-1409.
- Elkind, M., Sutton-Gilbert, H., Moses, W. B., Alescio, T., et Swain, R. W. (1965). Radiation response of mammalian cells grown in culture. v. temperature dependence of the repair of x-ray damage in surviving cells (aerobic and hypoxic). *Radiation Research*, 25, 359-376.
- Elyassaki, W., et Wu, S. (2006). Lipid rafts mediate ultraviolet light-induced Fas aggregation in M624 melanoma cells. *Photochemistry and Photobiology*, 82(3), 787-792.
- Engelman, J. A. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature Reviews. Cancer*, 9(8), 550-562.
- Engelman, J. A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J. O., Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, Johnson BE, Cantley LC, Jänne PA. (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5827), 1039-1043.
- Enslin, H., Brancho, D. M., et Davis, R. J. (2000). Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *The EMBO Journal*, 19(6), 1301-1311.
- Esen, M., Schreiner, B., Jendrossek, V., Lang, F., Fassbender, K., Grassmé, H., et Gulbins E. (2001). Mechanisms of Staphylococcus aureus induced apoptosis of human endothelial cells. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 6(6), 431-439.
- Faust, D., Dolado, I., Cuadrado, A., Oesch, F., Weiss, C., Nebreda, A. R., et Dietrich C. (2005). p38alpha MAPK is required for contact inhibition. *Oncogene*, 24(53), 7941-7945.
- Ferlinz, K., Hurwitz, R., Moczall, H., Lansmann, S., Schuchman, E. H., et Sandhoff, K. (1997). Functional characterization of the N-glycosylation sites of human acid sphingomyelinase by site-directed mutagenesis. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 243(1-2), 511-517.

## Références bibliographiques

---

- Ferrara, N. (2002). VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature Reviews. Cancer*, 2(10), 795-803.
- Fidorra, M., Duelund, L., Leidy, C., Simonsen, A. C., & Bagatolli, L. A. (2006). Absence of fluid-ordered/fluid-disordered phase coexistence in ceramide/POPC mixtures containing cholesterol. *Biophysical Journal*, 90(12), 4437-4451.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine*, 285(21), 1182-1186.
- Folkman, J., Watson, K., Ingber, D., et Hanahan, D. (1989). Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature*, 339(6219), 58-61.
- Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature Reviews. Drug Discovery*, 6(4), 273-286.
- Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M., et Breitman, M. L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 376(6535), 66-70.
- Fong, G. H., Zhang, L., Bryce, D. M., et Peng, J. (1999). Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development (Cambridge, England)*, 126(13), 3015-3025.
- Form, D. M., Pratt, B. M., et Madri, J. A. (1986). Endothelial cell proliferation during angiogenesis. In vitro modulation by basement membrane components. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 55(5), 521-530.
- Fowler, S. (1969). Lysosomal localization of sphingomyelinase in rat liver. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 191(2), 481-484.
- French, K. J., Schrecengost, R. S., Lee, B. D., Zhuang, Y., Smith, S. N., Eberly, J. L., Yun JK, Smith CD. (2003). Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Research*, 63(18), 5962-5969.
- Frese, K. K., et Tuveson, D. A. (2007). Maximizing mouse cancer models. *Nature Reviews. Cancer*, 7(9), 645-658.
- Freshney, N. W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J. et Saklatvala J. (1994). Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*, 78(6), 1039-1049.



## Références bibliographiques

---

- Fujikawa, K., de Aos Scherpenseel, I., Jain, S. K., Presman, E., Christensen, R. A., et Varticovski, L. (1999). Role of PI 3-kinase in angiopoietin-1-mediated migration and attachment-dependent survival of endothelial cells. *Experimental Cell Research*, 253(2), 663-672.
- Fuks, Z., Persaud, R. S., Alfieri, A., McLoughlin, M., Ehleiter, D., Schwartz, J. L., Seddon AP, Cordon-Cardo C, et Haimovitz-Friedman A. (1994). Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation-induced programmed cell death in vitro and in vivo. *Cancer Research*, 54(10), 2582-2590.
- Fukuda, M., Gotoh, Y., et Nishida, E. (1997). Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *The EMBO Journal*, 16(8), 1901-1908.
- Fukunaga, R., et Hunter, T. (1997). MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *The EMBO Journal*, 16(8), 1921-1933.
- Futerman, A. H., et Hannun, Y. A. (2004). The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Reports*, 5(8), 777-782.
- Gaengel, K., Genové, G., Armulik, A., & Betsholtz, C. (2009). Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(5), 630-638.
- Garcia-Barros, M., Paris, F., Cordon-Cardo, C., Lyden, D., Rafii, S., Haimovitz-Friedman, A., Fuks Z, et Kolesnick R. (2003). Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5622), 1155-1159.
- Garner, A. P., Weston, C. R., Todd, D. E., Balmanno, K., et Cook, S. J. (2002). Delta MEKK3:ER\* activation induces a p38 alpha/beta 2-dependent cell cycle arrest at the G2 checkpoint. *Oncogene*, 21(53), 8089-8104.
- Gatt, S. (1963). Enzymic hydrolysis and synthesis of ceramides. *The Journal of Biological Chemistry*, 238, 3131-3133.
- Ge, B., Gram, H., Di Padova, F., Huang, B., New, L., Ulevitch, R. J., Luo Y, et Han J. (2002). MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5558), 1291-1294.

## Références bibliographiques

---

- Gerber, H. P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B. A., Dixit, V., et Ferrara N. (1998). Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(46), 30336-30343.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, et Betsholtz C. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of Cell Biology*, 161(6), 1163-1177.
- Gerwins, P., Blank, J. L., et Johnson, G. L. (1997). Cloning of a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MEKK4, that selectively regulates the c-Jun amino terminal kinase pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(13), 8288-8295.
- Gilstring, C. F., Melin-Larsson, M., & Ljungdahl, P. O. (1999). Shr3p mediates specific COPII coatmer-cargo interactions required for the packaging of amino acid permeases into ER-derived transport vesicles. *Molecular Biology of the Cell*, 10(11), 3549-3565.
- Goebeler, M., Kilian, K., Gillitzer, R., Kunz, M., Yoshimura, T., Bröcker, E. B., Rapp UR, et Ludwig S. (1999). The MKK6/p38 stress kinase cascade is critical for tumor necrosis factor-alpha-induced expression of monocyte-chemoattractant protein-1 in endothelial cells. *Blood*, 93(3), 857-865.
- Göggel, R., Winoto-Morbach, S., Vielhaber, G., Imai, Y., Lindner, K., Brade, L., Brade H, Ehlers S, Slutsky AS, Schütze S, Gulbins E, et Uhlig S. (2004). PAF-mediated pulmonary edema: a new role for acid sphingomyelinase and ceramide. *Nature Medicine*, 10(2), 155-160.
- Gohda, M., Kunisawa, J., Miura, F., Kagiya, Y., Kurashima, Y., Higuchi, M., Ishikawa I, Ogahara I, et Kiyono H. (2008). Sphingosine 1-phosphate regulates the egress of IgA plasmablasts from Peyer's patches for intestinal IgA responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(8), 5335-5343.
- Goldkorn, T., Balaban, N., Shannon, M., Chea, V., Matsukuma, K., Gilchrist, D., Wang H, et Chan C. (1998). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 111 ( Pt 21), 3209-3220.
- Goloudina, A., Yamaguchi, H., Chervyakova, D. B., Appella, E., Fornace, A. J., et Bulavin, D. V. (2003). Regulation of human Cdc25A stability by Serine 75 phosphorylation is not sufficient to activate a S phase checkpoint. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 2(5), 473-478.

## Références bibliographiques

---

- Good, D. J., Polverini, P. J., Rastinejad, F., Le Beau, M. M., Lemons, R. S., Frazier, W. A., et Bouck NP. (1990). A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(17), 6624-6628.
- Gouazé, V., Mirault, M. E., Carpentier, S., Salvayre, R., Levade, T., et Andrieu-Abadie, N. (2001). Glutathione peroxidase-1 overexpression prevents ceramide production and partially inhibits apoptosis in doxorubicin-treated human breast carcinoma cells. *Molecular Pharmacology*, 60(3), 488-496.
- Goumans, M., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P., et ten Dijke, P. (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *The EMBO Journal*, 21(7), 1743-1753.
- Grassmé, H., Gulbins, E., Brenner, B., Ferlinz, K., Sandhoff, K., Harzer, K., Lang F, et Meyer TF. (1997). Acidic sphingomyelinase mediates entry of *N. gonorrhoeae* into nonphagocytic cells. *Cell*, 91(5), 605-615.
- Grassmé, H., Kirschnek, S., Riethmueller, J., Riehle, A., von Kürthy, G., Lang, F., Weller M, et Gulbins E. (2000). CD95/CD95 ligand interactions on epithelial cells in host defense to *Pseudomonas aeruginosa*. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5491), 527-530.
- Grassme, H., Jekle, A., Riehle, A., Schwarz, H., Berger, J., Sandhoff, K., Kolesnick R, et Gulbins E. (2001a). CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 20589-20596.
- Grassmé, H., Schwarz, H., et Gulbins, E. (2001b). Molecular mechanisms of ceramide-mediated CD95 clustering. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284(4), 1016-1030.
- Grassmé, H., Jendrossek, V., Bock, J., Riehle, A., et Gulbins, E. (2002). Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(1), 298-307.
- Grassmé, H., Cremesti, A., Kolesnick, R., et Gulbins, E. (2003a). Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene*, 22(35), 5457-5470.
- Grassmé, H., Jendrossek, V., Riehle, A., von Kürthy, G., Berger, J., Schwarz, H., Weller M, Kolesnick R, et Gulbins E. (2003b). Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nature Medicine*, 9(3), 322-330.

## Références bibliographiques

---

- Grassmé, H., Riehle, A., Wilker, B., et Gulbins, E. (2005). Rhinoviruses infect human epithelial cells via ceramide-enriched membrane platforms. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(28), 26256-26262.
- Greenberg, J. I., Shields, D. J., Barillas, S. G., Acevedo, L. M., Murphy, E., Huang, J., Schepke L, Stockmann C, Johnson RS, Angle N, Cheresch DA. (2008). A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature*, 456(7223), 809-813.
- Grether-Beck, S., Salahshour-Fard, M., Timmer, A., Brenden, H., Felsner, I., Walli, R., Füllekrug J, et Krutmann J. (2008). Ceramide and raft signaling are linked with each other in UVA radiation-induced gene expression. *Oncogene*, 27(35), 4768-4778.
- Gulbins, E., et Kolesnick, R. (2003). Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene*, 22(45), 7070-7077.
- Gum, R. J., McLaughlin, M. M., Kumar, S., Wang, Z., Bower, M. J., Lee, J. C., Adams JL, Livi GP, Goldsmith EJ, et Young PR. (1998). Acquisition of sensitivity of stress-activated protein kinases to the p38 inhibitor, SB 203580, by alteration of one or more amino acids within the ATP binding pocket. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(25), 15605-15610.
- Gupta, S., Campbell, D., Dérijard, B., et Davis, R. J. (1995). Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 267(5196), 389-393.
- Haimovitz-Friedman, A., Kan, C. C., Ehleiter, D., Persaud, R. S., McLoughlin, M., Fuks, Z., et Kolesnick RN. (1994). Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 180(2), 525-535.
- Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C., Bayoumy, S., Garzotto, M., McLoughlin, M., Gallily, R., Edwards CK 3rd, Schuchman EH, Fuks Z, et Kolesnick R. (1997). Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. *The Journal of Experimental Medicine*, 186(11), 1831-1841.
- Hall E.J., Editor, Radiobiology for the radiologist (4th edition), Lippincott, New York (1993)
- Hallahan, A. R., Pritchard, J. I., Chandraratna, R. A. S., Ellenbogen, R. G., Geyer, J. R., Overland, R. P., Strand AD, Tapscott SJ, et Olson JM. (2003). BMP-2 mediates retinoid-induced apoptosis in medulloblastoma cells through a paracrine effect. *Nature Medicine*, 9(8), 1033-1038.

## Références bibliographiques

---

- Halter, D., Neumann, S., van Dijk, S. M., Wolthoorn, J., de Mazière, A. M., Vieira, O. V., Mattjus P, Klumperman J, van Meer G, et Sprong H. (2007). Pre- and post-Golgi translocation of glucosylceramide in glycosphingolipid synthesis. *The Journal of Cell Biology*, 179(1), 101-115.
- Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L., et Ulevitch, R. J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5173), 808-811.
- Han, J., et Sun, P. (2007). The pathways to tumor suppression via route p38. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(8), 364-371.
- Han, Z. S., Enslin, H., Hu, X., Meng, X., Wu, I. H., Barrett, T., Davis RJ, et Ip YT. (1998). A conserved p38 mitogen-activated protein kinase pathway regulates Drosophila immunity gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 18(6), 3527-3539.
- Hanada, K., Kumagai, K., Tomishige, N., et Kawano, M. (2007). CERT and intracellular trafficking of ceramide. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1771(6), 644-653.
- Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M., et Nishijima M. (2003). Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature*, 426(6968), 803-809.
- Hanahan, D. (1985). Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature*, 315(6015), 115-122.
- Hanahan, D., Christofori, G., Naik, P., et Arbeit, J. (1996). Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 32A(14), 2386-2393.
- Hanahan, D., et Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353-364.
- Hanahan, D., et Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Hancock, J. F. (2006). Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(6), 456-462.
- Hannun, Y. A., et Luberto, C. (2004). Lipid metabolism: ceramide transfer protein adds a new dimension. *Current Biology: CB*, 14(4), R163-165.
- Hannun, Y. A., et Obeid, L. M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(2), 139-150.

## Références bibliographiques

---

- Harper, S. J., et LoGrasso, P. (2001). Signalling for survival and death in neurones: the role of stress-activated kinases, JNK and p38. *Cellular Signalling*, 13(5), 299-310.
- Harris, A. L. (2002). Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews. Cancer*, 2(1), 38-47.
- Harris, K., Lamson, R. E., Nelson, B., Hughes, T. R., Marton, M. J., Roberts, C. J., Boone C, et Pryciak PM. (2001). Role of scaffolds in MAP kinase pathway specificity revealed by custom design of pathway-dedicated signaling proteins. *Current Biology: CB*, 11(23), 1815-1824.
- Hassan, F., Morikawa, A., Islam, S., Tumurkhuu, G., Dagvadorj, J., Koide, N., et al. (2008). Lipopolysaccharide augments the in vivo lethal action of doxorubicin against mice via hepatic damage. *Clinical and Experimental Immunology*, 151(2), 334-340.
- Hauck, C. R., Grassmé, H., Bock, J., Jendrossek, V., Ferlinz, K., Meyer, T. F., et Gulbins E. (2000). Acid sphingomyelinase is involved in CEACAM receptor-mediated phagocytosis of *Neisseria gonorrhoeae*. *FEBS Letters*, 478(3), 260-266.
- Hawighorst, T., Velasco, P., Streit, M., Hong, Y. K., Kyriakides, T. R., Brown, L. F., Bornstein P, et Detmar M. (2001). Thrombospondin-2 plays a protective role in multistep carcinogenesis: a novel host anti-tumor defense mechanism. *The EMBO Journal*, 20(11), 2631-2640.
- Heerklotz, H. (2002). Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophysical Journal*, 83(5), 2693-2701.
- Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A., et Betsholtz, C. (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development (Cambridge, England)*, 126(14), 3047-3055.
- Hellström, M., Phng, L., Hofmann, J. J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., Alva J, Nilsson AK, Karlsson L, Gaiano N, Yoon K, Rossant J, Iruela-Arispe ML, Kalén M, Gerhardt H, et Betsholtz C. (2007). Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*, 445(7129), 776-780.
- Hirschi, K. K., Rohovsky, S. A., et D'Amore, P. A. (1998). PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *The Journal of Cell Biology*, 141(3), 805-814.

## Références bibliographiques

---

- Hla, T., Venkataraman, K., et Michaud, J. (2008). The vascular S1P gradient-cellular sources and biological significance. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1781(9), 477-482.
- Hobson, J. P., Rosenfeldt, H. M., Barak, L. S., Olivera, A., Poulton, S., Caron, M. G., Milstien S, et Spiegel S. (2001). Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5509), 1800-1803.
- Hoefen, R. J., et Berk, B. C. (2002). The role of MAP kinases in endothelial activation. *Vascular Pharmacology*, 38(5), 271-273.
- Hofmann, K., Tomiuk, S., Wolff, G., et Stoffel, W. (2000). Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg<sup>2+</sup>-dependent neutral sphingomyelinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(11), 5895-5900.
- Holash, J., Maisonpierre, P. C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C. R., Zagzag, D., Yancopoulos GD, et Wiegand SJ. (1999). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5422), 1994-1998.
- Holash, J., Wiegand, S. J., et Yancopoulos, G. D. (1999). New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene*, 18(38), 5356-5362.
- Holmes, W. F., Soprano, D. R., et Soprano, K. J. (2003). Early events in the induction of apoptosis in ovarian carcinoma cells by CD437: activation of the p38 MAP kinase signal pathway. *Oncogene*, 22(41), 6377-6386.
- Holopainen, J. M., Angelova, M. I., et Kinnunen, P. K. (2000). Vectorial budding of vesicles by asymmetrical enzymatic formation of ceramide in giant liposomes. *Biophysical Journal*, 78(2), 830-838.
- Hooper, N. M., et Turner, A. J. (1988). Ectoenzymes of the kidney microvillar membrane. Differential solubilization by detergents can predict a glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor. *The Biochemical Journal*, 250(3), 865-869.
- Horinouchi, K., Erlich, S., Perl, D. P., Ferlinz, K., Bisgaier, C. L., Sandhoff, K., Desnick RJ, Stewart CL, et Schuchman EH. (1995). Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. *Nature Genetics*, 10(3), 288-293.

## Références bibliographiques

---

- Hsu, P. P., et Sabatini, D. M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 134(5), 703-707.
- Huang, C., Ma, W. Y., Ding, M., Bowden, G. T., et Dong, Z. (1997). Direct evidence for an important role of sphingomyelinase in ultraviolet-induced activation of c-Jun N-terminal kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(44), 27753-27757.
- Huang, H. W., Goldberg, E. M., et Zidovetzki, R. (1999). Ceramides modulate protein kinase C activity and perturb the structure of Phosphatidylcholine/Phosphatidylserine bilayers. *Biophysical Journal*, 77(3), 1489-1497.
- Hui, L., Bakiri, L., Mairhorfer, A., Schweifer, N., Haslinger, C., Kenner, L., Komnenovic V, Scheuch H, Beug H, et Wagner EF. (2007). p38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. *Nature Genetics*, 39(6), 741-749.
- Huitema, K., van den Dikkenberg, J., Brouwers, J. F. H. M., et Holthuis, J. C. M. (2004). Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *The EMBO Journal*, 23(1), 33-44.
- Huot, J., Houle, F., Marceau, F., et Landry, J. (1997). Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circulation Research*, 80(3), 383-392.
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, et Kabbinavar F. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 350(23), 2335-2342.
- Hurwitz, R., Ferlinz, K., et Sandhoff, K. (1994). The tricyclic antidepressant desipramine causes proteolytic degradation of lysosomal sphingomyelinase in human fibroblasts. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 375(7), 447-450.
- Hutchison, M., Berman, K. S., et Cobb, M. H. (1998). Isolation of TAO1, a protein kinase that activates MEKs in stress-activated protein kinase cascades. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(44), 28625-28632.
- Huwiler, A., Kolter, T., Pfeilschifter, J., et Sandhoff, K. (2000). Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1485(2-3), 63-99.



## Références bibliographiques

---

- Hwang, Y., Tani, M., Nakagawa, T., Okino, N., et Ito, M. (2005). Subcellular localization of human neutral ceramidase expressed in HEK293 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(1), 37-42.
- Ichijo, H. (1999). From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene*, 18(45), 6087-6093.
- Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5296), 90-94.
- Igarashi, J., et Michel, T. (2001). Sphingosine 1-phosphate and isoform-specific activation of phosphoinositide 3-kinase beta. Evidence for divergence and convergence of receptor-regulated endothelial nitric-oxide synthase signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(39), 36281-36288.
- Ilangumaran, S., et Hoessli, D. C. (1998). Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *The Biochemical Journal*, 335 ( Pt 2), 433-440.
- Intensity-modulated radiotherapy: current status and issues of interest. (2001). *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 51(4), 880-914.
- Ip, Y. T., & Davis, R. J. (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(2), 205-219.
- Ipsen, J. H., Karlström, G., Mouritsen, O. G., Wennerström, H., et Zuckermann, M. J. (1987). Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 905(1), 162-172.
- Ipsen, J. H., Mouritsen, O. G., et Zuckermann, M. J. (1989). Theory of thermal anomalies in the specific heat of lipid bilayers containing cholesterol. *Biophysical Journal*, 56(4), 661-667.
- Ira, et Johnston, L. J. (2008). Sphingomyelinase generation of ceramide promotes clustering of nanoscale domains in supported bilayer membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1778(1), 185-197.
- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y, et Suda T. (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nature Medicine*, 12(4), 446-451.
- Jain, R. K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Medicine*, 9(6), 685-693.

## Références bibliographiques

---

- Jain, R. K. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5706), 58-62.
- Jain, R. K., Duda, D. G., Clark, J. W., et Loeffler, J. S. (2006). Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nature Clinical Practice. Oncology*, 3(1), 24-40.
- Jarvis, W. D., Kolesnick, R. N., Fornari, F. A., Traylor, R. S., Gewirtz, D. A., et Grant, S. (1994). Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(1), 73-77.
- Johnson, K. R., Johnson, K. Y., Crellin, H. G., Ogretmen, B., Boylan, A. M., Harley, R. A., et Obeid LM. (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(9), 1159-1166.
- Jolly, P. S., Bektas, M., Olivera, A., Gonzalez-Espinosa, C., Proia, R. L., Rivera, J., Milstien S, et Spiegel S. (2004). Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by FcepsilonRI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(7), 959-970.
- Kahya, N., Brown, D. A., et Schwille, P. (2005). Raft partitioning and dynamic behavior of human placental alkaline phosphatase in giant unilamellar vesicles. *Biochemistry*, 44(20), 7479-7489.
- Kaicker, S., McCrudden, K. W., Beck, L., New, T., Huang, J., Frischer, J. S., Serur A, Kadenhe-Chiweshe A, Yokoi A, Kandel JJ, et Yamashiro DJ. (2003). Thalidomide is anti-angiogenic in a xenograft model of neuroblastoma. *International Journal of Oncology*, 23(6), 1651-1655
- Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews. Cancer*, 3(6), 422-433.
- Kamb, A., Wee, S., et Lengauer, C. (2007). Why is cancer drug discovery so difficult? *Nature Reviews. Drug Discovery*, 6(2), 115-120.
- Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Bramley, A. H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, et Lyden D. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438(7069), 820-827.

## Références bibliographiques

---

- Karrenbauer, A., Jeckel, D., Just, W., Birk, R., Schmidt, R. R., Rothman, J. E., et Wieland FT. (1990). The rate of bulk flow from the Golgi to the plasma membrane. *Cell*, 63(2), 259-267.
- Kashkar, H., Wiegmann, K., Yazdanpanah, B., Haubert, D., et Krönke, M. (2005). Acid sphingomyelinase is indispensable for UV light-induced Bax conformational change at the mitochondrial membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(21), 20804-20813.
- Kawahara, A., Nishi, T., Hisano, Y., Fukui, H., Yamaguchi, A., et Mochizuki, N. (2009). The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5913), 524-527.
- Kawamori, T., Osta, W., Johnson, K. R., Pettus, B. J., Bielawski, J., Tanaka, T., Wargovich MJ, Reddy BS, Hannun YA, Obeid LM, et Zhou D. (2006). Sphingosine kinase 1 is up-regulated in colon carcinogenesis. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(2), 386-388.
- Kawamori, T., Kaneshiro, T., Okumura, M., Maalouf, S., Uflacker, A., Bielawski, J., Hannun YA, et Obeid LM. (2009). Role for sphingosine kinase 1 in colon carcinogenesis. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(2), 405-414.
- Kerbel, R. S. (1997). A cancer therapy resistant to resistance. *Nature*, 390(6658), 335-336.
- Kerbel, R. S., et Kamen, B. A. (2004). The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, 4(6), 423-436
- Killian, J. A., et van Meer, G. (2001). The 'double lives' of membrane lipids. Workshop: Anno 2000. A lipid milestone. *EMBO Reports*, 2(2), 91-95.
- Kim, M. Y., Linardic, C., Obeid, L., et Hannun, Y. (1991). Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon. Specific role in cell differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(1), 484-489.
- Kirchmair, R., Tietz, A. B., Panagiotou, E., Walter, D. H., Silver, M., Yoon, Y., Schratzberger P, Weber A, Kusano K, Weinberg DH, Ropper AH, Isner JM, et Losordo DW. (2007). Therapeutic angiogenesis inhibits or rescues chemotherapy-induced peripheral neuropathy: taxol- and thalidomide-induced injury of vasa nervorum is ameliorated by VEGF. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 15(1), 69-75.

## Références bibliographiques

---

- Kirschnek, S., Paris, F., Weller, M., Grassme, H., Ferlinz, K., Riehle, A., Fuks Z, Kolesnick R, et Gulbins E. (2000). CD95-mediated apoptosis in vivo involves acid sphingomyelinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(35), 27316-27323.
- Klement, G., Baruchel, S., Rak, J., Man, S., Clark, K., Hicklin, D. J., Bohlen P, et Kerbel RS. (2000). Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *The Journal of Clinical Investigation*, 105(8), R15-24.
- Knobloch, J., et Rüther, U. (2008). Shedding light on an old mystery: thalidomide suppresses survival pathways to induce limb defects. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(9), 1121-1127.
- Kobayashi, N., Nishi, T., Hirata, T., Kihara, A., Sano, T., Igarashi, Y., et Yamaguchi A. (2006). Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner. *Journal of Lipid Research*, 47(3), 614-621.
- Kolesnick, R. N. (1989). Thyrotropin-releasing hormone and phorbol esters stimulate sphingomyelin synthesis in GH3 pituitary cells. Evidence for involvement of protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(20), 11688-11692.
- Kolesnick, R. N., Goñi, F. M., et Alonso, A. (2000). Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *Journal of Cellular Physiology*, 184(3), 285-300.
- Kölzer, M., Werth, N., et Sandhoff, K. (2004). Interactions of acid sphingomyelinase and lipid bilayers in the presence of the tricyclic antidepressant desipramine. *FEBS Letters*, 559(1-3), 96-98.
- Komarova, E. A., Kondratov, R. V., Wang, K., Christov, K., Golovkina, T. V., Goldblum, J. R., et Gudkov AV. (2004). Dual effect of p53 on radiation sensitivity in vivo: p53 promotes hematopoietic injury, but protects from gastro-intestinal syndrome in mice. *Oncogene*, 23(19), 3265-3271.
- Komatsu, M., Takahashi, T., Abe, T., Takahashi, I., Ida, H., et Takada, G. (2001). Evidence for the association of ultraviolet-C and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis with acid sphingomyelinase activation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1533(1), 47-54.
- Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T. T., Cominelli, F., et Kollias, G. (1999). Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity*, 10(3), 387-398.

## Références bibliographiques

---

- Koppenhoefer, U., Brenner, B., Lang, F., et Gulbins, E. (1997). The CD40-ligand stimulates T-lymphocytes via the neutral sphingomyelinase: a novel function of the CD40-ligand as signalling molecule. *FEBS Letters*, 414(2), 444-448.
- Kornfeld, S., et Mellman, I. (1989). The biogenesis of lysosomes. *Annual Review of Cell Biology*, 5, 483-525.
- Kotlyarov, A., Neininger, A., Schubert, C., Eckert, R., Birchmeier, C., Volk, H. D., et Gaestel M. (1999). MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. *Nature Cell Biology*, 1(2), 94-97.
- Koval, M., et Pagano, R. E. (1989). Lipid recycling between the plasma membrane and intracellular compartments: transport and metabolism of fluorescent sphingomyelin analogues in cultured fibroblasts. *The Journal of Cell Biology*, 108(6), 2169-2181.
- Krut, O., Wiegmann, K., Kashkar, H., Yazdanpanah, B., et Krönke, M. (2006). Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(19), 13784-13793.
- Kumar, P., Miller, A. I., et Polverini, P. J. (2004). p38 MAPK mediates gamma-irradiation-induced endothelial cell apoptosis, and vascular endothelial growth factor protects endothelial cells through the phosphoinositide 3-kinase-Akt-Bcl-2 pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(41), 43352-43360.
- Kumar, P., Coltas, I. K., Kumar, B., Chepeha, D. B., Bradford, C. R., et Polverini, P. J. (2007). Bcl-2 protects endothelial cells against gamma-radiation via a Raf-MEK-ERK-survivin signaling pathway that is independent of cytochrome c release. *Cancer Research*, 67(3), 1193-1202.
- Kwon, Y. G., Min, J. K., Kim, K. M., Lee, D. J., Billiar, T. R., et Kim, Y. M. (2001). Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(14), 10627-10633.
- Kyriakis, J. M., et Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews*, 81(2), 807-869.
- Kyriakis, J. M., et Avruch, J. (1996). Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(40), 24313-24316.

## Références bibliographiques

---

- Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch J. et Woodgett JR. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*, 369(6476), 156-160
- Lacour, S., Hammann, A., Grazide, S., Lagadic-Gossmann, D., Athias, A., Sergent, O., Laurent G, Gambert P, Solary E, et Dimanche-Boitrel MT. (2004). Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. *Cancer Research*, 64(10), 3593-3598.
- Landry, J., et Huot, J. (1995). Modulation of actin dynamics during stress and physiological stimulation by a signaling pathway involving p38 MAP kinase and heat-shock protein 27. *Biochemistry and Cell Biology*, 73(9-10), 703-707.
- Lawler, J., Miao, W. M., Duquette, M., Bouck, N., Bronson, R. T., et Hynes, R. O. (2001). Thrombospondin-1 gene expression affects survival and tumor spectrum of p53-deficient mice. *The American Journal of Pathology*, 159(5), 1949-1956.
- Lawrence, T. S., Davis, M. A., Hough, A., & Rehemtulla, A. (2001). The role of apoptosis in 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine (gemcitabine)-mediated radiosensitization. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(2), 314-319.
- Lee, J. C., Kumar, S., Griswold, D. E., Underwood, D. C., Votta, B. J., et Adams, J. L. (2000). Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacology*, 47(2-3), 185-201.
- Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, et Landvatter SW,. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, 372(6508), 739-746.
- Lee, M. J., Evans, M., et Hla, T. (1996). The inducible G protein-coupled receptor edg-1 signals via the G(i)/mitogen-activated protein kinase pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(19), 11272-11279.
- Lee, M. J., Thangada, S., Claffey, K. P., Ancellin, N., Liu, C. H., Kluk, M., Volpi M, Sha'afi RI, et Hla T. (1999). Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell*, 99(3), 301-312.
- Lee, M. J., Van Brocklyn, J. R., Thangada, S., Liu, C. H., Hand, A. R., Menzeleev, R., Spiegel S, et Hla T. (1998). Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5356), 1552-1555.

## Références bibliographiques

---

- Lee, S. H., Schloss, D. J., et Swain, J. L. (2000). Maintenance of vascular integrity in the embryo requires signaling through the fibroblast growth factor receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(43), 33679-33687.
- Lee, S., Kim, W., Kim, D. H., Moon, S., Jung, Y. J., Lee, A. S., Kang KP, Jang KY, Lee SY, Sung MJ, Koh GY, et Park SK. (2008). Protective effect of COMP-angiopoietin-1 on cyclosporine-induced renal injury in mice. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 23(9), 2784-2794.
- Lemaire, S. D., Richardson, J. M., Goyer, A., Keryer, E., Lancelin, J. M., Makhatadze, G. I., et Jacquot JP. (2000). Primary structure determinants of the pH- and temperature-dependent aggregation of thioredoxin. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1476(2), 311-323.
- Le Noble, F., Moyon, D., Pardanaud, L., Yuan, L., Djonov, V., Matthijsen, R., Bréant C, Fleury V, et Eichmann A. (2004). Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. *Development (Cambridge, England)*, 131(2), 361-375.
- Le Scolan, E., Pchejetski, D., Banno, Y., Denis, N., Mayeux, P., Vainchenker, W., Levade T, et Moreau-Gachelin F. (2005). Overexpression of sphingosine kinase 1 is an oncogenic event in erythroleukemic progression. *Blood*, 106(5), 1808-1816.
- Levade, T., Gatt, S., Maret, A., et Salvayre, R. (1991). Different pathways of uptake and degradation of sphingomyelin by lymphoblastoid cells and the potential participation of the neutral sphingomyelinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(21), 13519-13529.
- Levrán, O., Desnick, R. J., et Schuchman, E. H. (1993). Type A Niemann-Pick disease: a frameshift mutation in the acid sphingomyelinase gene (fsP330) occurs in Ashkenazi Jewish patients. *Human Mutation*, 2(4), 317-319.
- Levrán, O., Desnick, R. J., et Schuchman, E. H. (1991). Niemann-Pick disease: a frequent missense mutation in the acid sphingomyelinase gene of Ashkenazi Jewish type A and B patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(9), 3748-3752.
- Li, C. M., Hong, S. B., Kopal, G., He, X., Linke, T., Hou, W. S., Koch J, Gatt S, Sandhoff K, et Schuchman EH. (1998). Cloning and characterization of the full-length cDNA and genomic sequences encoding murine acid ceramidase. *Genomics*, 50(2), 267-274.

## Références bibliographiques

---

- Li, C. Y., Shan, S., Huang, Q., Braun, R. D., Lanzen, J., Hu, K., Lin P, et Dewhirst MW. (2000). Initial stages of tumor cell-induced angiogenesis: evaluation via skin window chambers in rodent models. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(2), 143-147.
- Li, C., Park, J., Simonaro, C. M., He, X., Gordon, R. E., Friedman, A., Ehleiter D, Paris F, Manova K, Hepbilkler S, Fuks Z, Sandhoff K, Kolesnick R, et Schuchman EH. (2002). Insertional mutagenesis of the mouse acid ceramidase gene leads to early embryonic lethality in homozygotes and progressive lipid storage disease in heterozygotes. *Genomics*, 79(2), 218-224.
- Li, J., Guan, H., Gong, L., Song, L., Zhang, N., Wu, J., Yuan J, Zheng YJ, Huang ZS, et Li M. (2008). Clinical significance of sphingosine kinase-1 expression in human astrocytomas progression and overall patient survival. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(21), 6996-7003.
- Li, Q., Huang, W., Duan, H., Wang, H., Wu, C., et Wang, L. (2007). Sphingosine kinase-1 mediates BCR/ABL-induced upregulation of Mcl-1 in chronic myeloid leukemia cells. *Oncogene*, 26(57), 7904-7908.
- Li, W., Yu, C., Xia, J., Zhang, L., Weng, G., Zheng, H., Kong QL, Hu LJ, Zeng MS, Zeng YX, Li M, Li J, et Song LB. (2009). Sphingosine kinase 1 is associated with gastric cancer progression and poor survival of patients. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(4), 1393-1399.
- Li, Y., Chen, P., Haimovitz-Friedman, A., Reilly, R. M., et Wong, C. S. (2003). Endothelial apoptosis initiates acute blood-brain barrier disruption after ionizing radiation. *Cancer Research*, 63(18), 5950-5956.
- Lightbody, J., Wiesmann, U., Hadorn, B., et Herschkowitz, N. (1971). I-cell disease: multiple lysosomal-enzyme defect. *Lancet*, 1(7696), 451.
- Lim, C. P., Jain, N., et Cao, X. (1998). Stress-induced immediate-early gene, egr-1, involves activation of p38/JNK1. *Oncogene*, 16(22), 2915-2926.
- Lin, T., Genestier, L., Pinkoski, M. J., Castro, A., Nicholas, S., Mogil, R., Paris F, Fuks Z, Schuchman EH, Kolesnick RN, et Green DR. (2000). Role of acidic sphingomyelinase in Fas/CD95-mediated cell death. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8657-8663.



## Références bibliographiques

---

- Lin, X., Hengartner, M. O., et Kolesnick, R. (1998). *Caenorhabditis elegans* contains two distinct acid sphingomyelinases. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(23), 14374-14379.
- Lindahl, P., Johansson, B. R., Levéen, P., et Betsholtz, C. (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science (New York, N.Y.)*, *277*(5323), 242-245.
- Liu, C. H., et Hla, T. (1997). The mouse gene for the inducible G-protein-coupled receptor *edg-1*. *Genomics*, *43*(1), 15-24.
- Liu, C. H., Thangada, S., Lee, M. J., Van Brocklyn, J. R., Spiegel, S., et Hla, T. (1999). Ligand-induced trafficking of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1. *Molecular Biology of the Cell*, *10*(4), 1179-1190.
- Liu, H., Nishitoh, H., Ichijo, H., et Kyriakis, J. M. (2000). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(6), 2198-2208.
- Liu, J., Mathias, S., Yang, Z., et Kolesnick, R. N. (1994). Renaturation and tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulation of a 97-kDa ceramide-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(4), 3047-3052.
- Liu, W., Ahmad, S. A., Reinmuth, N., Shaheen, R. M., Jung, Y. D., Fan, F., et Ellis LM. (2000a). Endothelial cell survival and apoptosis in the tumor vasculature. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, *5*(4), 323-328.
- Liu, W., Reinmuth, N., Stoeltzing, O., Parikh, A. A., Fan, F., Ahmad, S., Jung YD, et Ellis LM. (2002). Antiangiogenic therapy targeting factors that enhance endothelial cell survival. *Seminars in Oncology*, *29*(3 Suppl 11), 96-103.
- Liu, Y., Wada, R., Yamashita, T., Mi, Y., Deng, C. X., Hobson, J. P., Rosenfeldt HM, Nava VE, Chae SS, Lee MJ, Liu CH, Hla T, Spiegel S, et Proia RL. (2000). *Edg-1*, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *The Journal of Clinical Investigation*, *106*(8), 951-961.
- López-Avilés, S., Grande, M., González, M., Helgesen, A., Alemany, V., Sanchez-Piris, M., Bachs O, Millar JB, et Aligue R. (2005). Inactivation of the Cdc25 phosphatase by the stress-activated *Srk1* kinase in fission yeast. *Molecular Cell*, *17*(1), 49-59. doi: 10.1016/j.molcel.2004.11.043.

## Références bibliographiques

---

- Losa, J. H., Parada Cobo, C., Cobo, C. P., Viniestra, J. G., Sánchez-Arevalo Lobo, V. J., Ramón y Cajal, S., et Sánchez-Prieto R. (2003). Role of the p38 MAPK pathway in cisplatin-based therapy. *Oncogene*, 22(26), 3998-4006.
- Lowe, S. W., Cepero, E., et Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 432(7015), 307-315.
- Lu, H. T., Yang, D. D., Wysk, M., Gatti, E., Mellman, I., Davis, R. J., et Flavell RA. (1999). Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *The EMBO Journal*, 18(7), 1845-1857.
- Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajjar KA, Manova K, Benezra R, et Rafii. (2001). Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nature Medicine*, 7(11), 1194-1201.
- Ma, H., Calderon, T. M., Fallon, J. T., et Berman, J. W. (2002). Hepatocyte growth factor is a survival factor for endothelial cells and is expressed in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, 164(1), 79-87.
- Maceyka, M., Milstien, S., et Spiegel, S. (2009). Sphingosine-1-phosphate: the Swiss army knife of sphingolipid signaling. *Journal of Lipid Research*, 50 Suppl, S272-276.
- Machino, T., Hashimoto, S., Maruoka, S., Gon, Y., Hayashi, S., Mizumura, K., Nishitoh H, Ichijo H, et Horie T. (2003). Apoptosis signal-regulating kinase 1-mediated signaling pathway regulates hydrogen peroxide-induced apoptosis in human pulmonary vascular endothelial cells. *Critical Care Medicine*, 31(12), 2776-2781.
- Maekawa, H., Oike, Y., Kanda, S., Ito, Y., Yamada, Y., Kurihara, H., Nagai R, et Suda T. (2003). Ephrin-B2 induces migration of endothelial cells through the phosphatidylinositol-3 kinase pathway and promotes angiogenesis in adult vasculature. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(11), 2008-2014.
- Magnoni, C., Euclidi, E., Benassi, L., Bertazzoni, G., Cossarizza, A., Seidenari, S., et Giannetti A. (2002). Ultraviolet B radiation induces activation of neutral and acidic sphingomyelinases and ceramide generation in cultured normal human keratinocytes. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 16(4), 349-355.

## Références bibliographiques

---

- Maj, J. G., Paris, F., Haimovitz-Friedman, A., Venkatraman, E., Kolesnick, R., et Fuks, Z. (2003). Microvascular function regulates intestinal crypt response to radiation. *Cancer Research*, 63(15), 4338-4341.
- Maltepe, E., Schmidt, J. V., Baunoch, D., Bradfield, C. A., et Simon, M. C. (1997). Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature*, 386(6623), 403-407.
- Mandala, S. M., Thornton, R. A., Rosenbach, M., Milligan, J., Garcia-Calvo, M., Bull, H. G., et Kurtz MB. (1997). Khafrefungin, a novel inhibitor of sphingolipid synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(51), 32709-32714.
- Mandala, S., Hajdu, R., Bergstrom, J., Quackenbush, E., Xie, J., Milligan, J., Thornton R, Shei GJ, Card D, Keohane C, Rosenbach M, Hale J, Lynch CL, Rupprecht K, Parsons W, et Rosen H. (2002). Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5566), 346-349.
- Mandon, E. C., Ehses, I., Rother, J., van Echten, G., et Sandhoff, K. (1992). Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(16), 11144-11148.
- Manke, I. A., Nguyen, A., Lim, D., Stewart, M. Q., Elia, A. E. H., et Yaffe, M. B. (2005). MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Molecular Cell*, 17(1), 37-48.
- Mansat-de Mas, V., Bezombes, C., Quillet-Mary, A., Bettaïeb, A., D'orgeix, A. D., Laurent, G., et Jaffrézou JP. (1999). Implication of radical oxygen species in ceramide generation, c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis induced by daunorubicin. *Molecular Pharmacology*, 56(5), 867-874.
- Månsson-Broberg, A., Siddiqui, A. J., Genander, M., Grinnemo, K., Hao, X., Andersson, A. B., Wårdell E, Sylvén C, et Corbascio M. (2008). Modulation of ephrinB2 leads to increased angiogenesis in ischemic myocardium and endothelial cell proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373(3), 355-359.
- Mao, C., et Obeid, L. M. (2008). Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1781(9), 424-434.

## Références bibliographiques

---

- Mao, Z., Bonni, A., Xia, F., Nadal-Vicens, M., & Greenberg, M. E. (1999). Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5440), 785-790.
- Marathe, S., Schissel, S. L., Yellin, M. J., Beatini, N., Mintzer, R., Williams, K. J., et Tabas I. (1998). Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(7), 4081-4088.
- Maroulakou, I. G., Oemler, W., Naber, S. P., et Tschlis, P. N. (2007). Akt1 ablation inhibits, whereas Akt2 ablation accelerates, the development of mammary adenocarcinomas in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2/neu and MMTV-polyoma middle T transgenic mice. *Cancer Research*, 67(1), 167-177.
- Martin, S. A., Lord, C. J., et Ashworth, A. (2008). DNA repair deficiency as a therapeutic target in cancer. *Current Opinion in Genetics et Development*, 18(1), 80-86.
- Mathias, S., Dressler, K. A., et Kolesnick, R. N. (1991). Characterization of a ceramide-activated protein kinase: stimulation by tumor necrosis factor alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(22), 10009-10013.
- Matsunaga, S., Okigaki, M., Takeda, M., Matsui, A., Honsho, S., Katsume, A., Kishita E, Jishan C, Kurihara T, Adachi Y, Mansukhani A, Kobara M, Matoba Y, Tatsumi T, et Matsubara H. (2009). Endothelium-targeted overexpression of constitutively active FGF receptor induces cardioprotection in mice myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46(5), 663-673.
- Matsuyama, W., Faure, M., et Yoshimura, T. (2003). Activation of discoidin domain receptor 1 facilitates the maturation of human monocyte-derived dendritic cells through the TNF receptor associated factor 6/TGF-beta-activated protein kinase 1 binding protein 1 beta/p38 alpha mitogen-activated protein kinase signaling cascade. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171(7), 3520-3532.
- Maxfield, F. R., et Mondal, M. (2006). Sterol and lipid trafficking in mammalian cells. *Biochemical Society Transactions*, 34(Pt 3), 335-339.
- Maxfield, F. R., et McGraw, T. E. (2004). Endocytic recycling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(2), 121-132.

## Références bibliographiques

---

- Maxwell, P. H., Dachs, G. U., Gleadle, J. M., Nicholls, L. G., Harris, A. L., Stratford, I. J., et Hankinson O, Pugh CW, et Ratcliffe PJ. (1997). Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(15), 8104-8109.
- Mayor, S., Presley, J. F., et Maxfield, F. R. (1993). Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. *The Journal of Cell Biology*, 121(6), 1257-1269.
- McCarty, M. F., Somcio, R. J., Stoeltzing, O., Wey, J., Fan, F., Liu, W., Bucana C, et Ellis LM. (2007). Overexpression of PDGF-BB decreases colorectal and pancreatic cancer growth by increasing tumor pericyte content. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(8), 2114-2122.
- McCubrey, J. A., Lahair, M. M., et Franklin, R. A. (2006). Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxidants et Redox Signaling*, 8(9-10), 1775-1789.
- Megha, Bakht, O., et London, E. (2006). Cholesterol precursors stabilize ordinary and ceramide-rich ordered lipid domains (lipid rafts) to different degrees. Implications for the Bloch hypothesis and sterol biosynthesis disorders. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(31), 21903-21913.
- Megha, et London, E. (2004). Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): implications for lipid raft structure and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(11), 9997-10004.
- Mellman, I., et Warren, G. (2000). The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell*, 100(1), 99-112.
- Mercier, C., Declèves, X., Maseguin, C., Fragner, P., Tardy, M., Roux, F., Gabrion J, et Scherrmann JM. (2003). P-glycoprotein (ABCB1) but not multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1) is induced by doxorubicin in primary cultures of rat astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 87(4), 820-830.
- Merrill, A. H., Sereni, A. M., Stevens, V. L., Hannun, Y. A., Bell, R. M., et Kinkade, J. M. (1986). Inhibition of phorbol ester-dependent differentiation of human promyelocytic leukemic (HL-60) cells by sphinganine and other long-chain bases. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(27), 12610-12615.

## Références bibliographiques

---

- Merritt, A. J., Allen, T. D., Potten, C. S., et Hickman, J. A. (1997). Apoptosis in small intestinal epithelial from p53-null mice: evidence for a delayed, p53-independent G2/M-associated cell death after gamma-irradiation. *Oncogene*, *14*(23), 2759-2766.
- Michel, C., et van Echten-Deckert, G. (1997). Conversion of dihydroceramide to ceramide occurs at the cytosolic face of the endoplasmic reticulum. *FEBS Letters*, *416*(2), 153-155.
- Michel, C., van Echten-Deckert, G., Rother, J., Sandhoff, K., Wang, E., et Merrill, A. H. (1997). Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-trans-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(36), 22432-22437.
- Mielke, K., et Herdegen, T. (2000). JNK and p38 stress kinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Progress in Neurobiology*, *61*(1), 45-60.
- Mintz, B., et Illmensee, K. (1975). Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *72*(9), 3585-3589.
- Miquerol, L., Langille, B. L., et Nagy, A. (2000). Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development (Cambridge, England)*, *127*(18), 3941-3946.
- Mitra, P., Oskeritzian, C. A., Payne, S. G., Beaven, M. A., Milstien, S., et Spiegel, S. (2006). Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(44), 16394-16399.
- Mitsutake, S., et Igarashi, Y. (2007). Transbilayer movement of ceramide in the plasma membrane of live cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *359*(3), 622-627.
- Moeller, B. J., Cao, Y., Li, C. Y., et Dewhirst, M. W. (2004). Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell*, *5*(5), 429-441.
- Moeller, B. J., Cao, Y., Li, C. Y., & Dewhirst, M. W. (2004). Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell*, *5*(5), 429-441.

## Références bibliographiques

---

- Molnár, A., Theodoras, A. M., Zon, L. I., et Kyriakis, J. M. (1997). Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/RK. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(20), 13229-13235.
- Monnier, Y., Farmer, P., Bieler, G., Imaizumi, N., Sengstag, T., Alghisi, G. C., Stehle JC, Ciarloni L, Andrejevic-Blant S, Moeckli R, Mirimanoff RO, Goodman SL, Delorenzi M, et Rüegg C. (2008). CYR61 and alphaVbeta5 integrin cooperate to promote invasion and metastasis of tumors growing in preirradiated stroma. *Cancer Research*, 68(18), 7323-7331.
- Morales-Ruiz, M., Lee, M. J., Zöllner, S., Gratton, J. P., Scotland, R., Shiojima, I., Walsh K, Hla T, et Sessa WC. (2001). Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a Gi protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(22), 19672-19677.
- Moreira, A. L., Friedlander, D. R., Shif, B., Kaplan, G., et Zagzag, D. (1999). Thalidomide and a thalidomide analogue inhibit endothelial cell proliferation in vitro. *Journal of Neuro-Oncology*, 43(2), 109-114.
- Morikawa, S., Baluk, P., Kaidoh, T., Haskell, A., Jain, R. K., et McDonald, D. M. (2002). Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *The American Journal of Pathology*, 160(3), 985-1000.
- Morimoto, A., Okamura, K., Hamanaka, R., Sato, Y., Shima, N., Higashio, K., et Kuwano M. (1991). Hepatocyte growth factor modulates migration and proliferation of human microvascular endothelial cells in culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 179(2), 1042-1049.
- Morita, Y., Perez, G. I., Paris, F., Miranda, S. R., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Fuks Z, Xie Z, Reed JC, Schuchman EH, Kolesnick RN, et Tilly JL. (2000). Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nature Medicine*, 6(10), 1109-1114.
- Morrison, D. K., et Davis, R. J. (2003). Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19, 91-118.
- Mudgett, J. S., Ding, J., Guh-Siesel, L., Chartrain, N. A., Yang, L., Gopal, S., et Shen MM. (2000). Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(19), 10454-10459.

## Références bibliographiques

---

- Munro, S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*, 115(4), 377-388.
- Murakami, M., Nguyen, L. T., Zhang, Z. W., Moodie, K. L., Carmeliet, P., Stan, R. V., et Simons M. (2008). The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(10), 3355-3366.
- Nagata, K. I., Puls, A., Futter, C., Aspenstrom, P., Schaefer, E., Nakata, T., Hirokawa N, et Hall A. (1998). The MAP kinase kinase kinase MLK2 co-localizes with activated JNK along microtubules and associates with kinesin superfamily motor KIF3. *The EMBO Journal*, 17(1), 149-158.
- Nava, V. E., Hobson, J. P., Murthy, S., Milstien, S., et Spiegel, S. (2002). Sphingosine kinase type 1 promotes estrogen-dependent tumorigenesis of breast cancer MCF-7 cells. *Experimental Cell Research*, 281(1), 115-127.
- Nawrocki, S. T., Sweeney-Gotsch, B., Takamori, R., et McConkey, D. J. (2004). The proteasome inhibitor bortezomib enhances the activity of docetaxel in orthotopic human pancreatic tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(1), 59-70.
- Naya, F. J., Black, B. L., Wu, H., Bassel-Duby, R., Richardson, J. A., Hill, J. A., et Olson EN. (2002). Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor. *Nature Medicine*, 8(11), 1303-1309.
- Nebreda, A. R., et Porras, A. (2000). p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(6), 257-260.
- Nedzi, L. A. (2008). The implementation of ablative hypofractionated radiotherapy for stereotactic treatments in the brain and body: observations on efficacy and toxicity in clinical practice. *Seminars in Radiation Oncology*, 18(4), 265-272.
- New, L., Jiang, Y., Zhao, M., Liu, K., Zhu, W., Flood, L. J., Kato Y, Parry GC, et Han J. (1998). PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *The EMBO Journal*, 17(12), 3372-3384.
- Ni, X., et Morales, C. R. (2006). The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 7(7), 889-902.
- Nissen, L. J., Cao, R., Hedlund, E., Wang, Z., Zhao, X., Wetterskog, D., Funa K, Bråkenhielm E, et Cao Y. (2007). Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(10), 2766-2777.



## Références bibliographiques

---

- Noda, S., Yoshimura, S., Sawada, M., Naganawa, T., Iwama, T., Nakashima, S., et Sakai N. (2001). Role of ceramide during cisplatin-induced apoptosis in C6 glioma cells. *Journal of Neuro-Oncology*, 52(1), 11-21.
- Noguera-Troise, I., Daly, C., Papadopoulos, N. J., Coetsee, S., Boland, P., Gale, N. W., Lin HC, Yancopoulos GD, et Thurston G. (2006). Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature*, 444(7122), 1032-1037.
- Nolan, D. J., Ciarrocchi, A., Mellick, A. S., Jaggi, J. S., Bambino, K., Gupta, S., Heikamp E, McDevitt MR, Scheinberg DA, Benezra R, et Mittal V. (2007). Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes et Development*, 21(12), 1546-1558.
- Nurminen, T. A., Holopainen, J. M., Zhao, H., et Kinnunen, P. K. J. (2002). Observation of topical catalysis by sphingomyelinase coupled to microspheres. *Journal of the American Chemical Society*, 124(41), 12129-12134.
- Obata, T., Brown, G. E., et Yaffe, M. B. (2000). MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway. *Critical Care Medicine*, 28(4 Suppl), N67-77.
- Obeid, L. M., Linardic, C. M., Karolak, L. A., et Hannun, Y. A. (1993). Programmed cell death induced by ceramide. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5102), 1769-1771.
- Oh, P., Li, Y., Yu, J., Durr, E., Krasinska, K. M., Carver, L. A., Testa JE, et Schnitzer JE. (2004). Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy. *Nature*, 429(6992), 629-635.
- Okazaki, T., Bielawska, A., Bell, R. M., et Hannun, Y. A. (1990). Role of ceramide as a lipid mediator of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cell differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(26), 15823-15831.
- Okunieff, P., Mester, M., Wang, J., Maddox, T., Gong, X., Tang, D., Coffee M, et Ding I. (1998). In vivo radioprotective effects of angiogenic growth factors on the small bowel of C3H mice. *Radiation Research*, 150(2), 204-211.
- Olivera, A., et Spiegel, S. (1993). Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature*, 365(6446), 557-560.
- Olson, J. M., et Hallahan, A. R. (2004). p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine*, 10(3), 125-129.

## Références bibliographiques

---

- Ono, K., et Han, J. (2000). The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cellular Signalling*, 12(1), 1-13.
- O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, et Folkman J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88(2), 277-285.
- Oskouian, B., Sooriyakumaran, P., Borowsky, A. D., Crans, A., Dillard-Telm, L., Tam, Y. Y., Bandhuvula P, et Saba JD. (2006). Sphingosine-1-phosphate lyase potentiates apoptosis via p53- and p38-dependent pathways and is down-regulated in colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46), 17384-17389.
- Otterbach, B., et Stoffel, W. (1995). Acid sphingomyelinase-deficient mice mimic the neurovisceral form of human lysosomal storage disease (Niemann-Pick disease). *Cell*, 81(7), 1053-1061.
- Ozawa, C. R., Banfi, A., Glazer, N. L., Thurston, G., Springer, M. L., Kraft, P. E., McDonald DM, et Blau HM. (2004). Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(4), 516-527.
- Padera, T. P., Stoll, B. R., Tooredman, J. B., Capen, D., di Tomaso, E., et Jain, R. K. (2004). Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature*, 427(6976), 695.
- Pàez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Viñals, F., Inoue M, Bergers G, Hanahan D, et Casanovas O. (2009). Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell*, 15(3), 220-231.
- Paik, J., Skoura, A., Chae, S., Cowan, A. E., Han, D. K., Proia, R. L., et Hla T. (2004). Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization. *Genes et Development*, 18(19), 2392-2403.
- Pao, W., Miller, V. A., Politi, K. A., Riely, G. J., Somwar, R., Zakowski, M. F., Kris MG, et Varmus H. (2005). Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Medicine*, 2(3), e73.
- Papapetropoulos, A., Fulton, D., Mahboubi, K., Kalb, R. G., O'Connor, D. S., Li, F., Altieri DC, et Sessa WC. (2000). Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(13), 9102-9105.

## Références bibliographiques

---

- Pappu, R., Schwab, S. R., Cornelissen, I., Pereira, J. P., Regard, J. B., Xu, Y., Camerer E, Zheng YW, Huang Y, Cyster JG, et Coughlin SR. (2007). Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5822), 295-298.
- Paris, F., Fuks, Z., Kang A, Capodieci P, Juan G, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, et Kolesnick R. (2001a). Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5528), 293-297.
- Paris, F., Grassmé, H., Cremesti, A., Zager, J., Fong, Y., Haimovitz-Friedman, A., Fuks Z, Gulbins E, et Kolesnick R. (2001). Natural ceramide reverses Fas resistance of acid sphingomyelinase(-/-) hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 8297-8305.
- Park, J. M., Greten, F. R., Li, Z., et Karin, M. (2002). Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5589), 2048-2051.
- Park, S., Zarrinpar, A., et Lim, W. A. (2003). Rewiring MAP kinase pathways using alternative scaffold assembly mechanisms. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5609), 1061-1064.
- Pasqualini, R., et Ruoslahti, E. (1996). Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature*, 380(6572), 364-366.
- Paugh, S. W., Paugh, B. S., Rahmani, M., Kapitonov, D., Almenara, J. A., Kordula, T., Milstien S, Adams JK, Zipkin RE, Grant S, et Spiegel S. (2008). A selective sphingosine kinase 1 inhibitor integrates multiple molecular therapeutic targets in human leukemia. *Blood*, 112(4), 1382-1391.
- Pchejetski, D., Doumerc, N., Golzio, M., Naymark, M., Teissié, J., Kohama, T., Waxman J, Malavaud B, et Cuvillier O. (2008). Chemosensitizing effects of sphingosine kinase-1 inhibition in prostate cancer cell and animal models. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(7), 1836-1845.
- Pelengaris, S., Khan, M., et Evan, G. I. (2002). Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell*, 109(3), 321-334.
- Peña, L. A., Fuks, Z., et Kolesnick, R. N. (2000). Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency. *Cancer Research*, 60(2), 321-327.

## Références bibliographiques

---

- Peters, K. G., Kontos, C. D., Lin, P. C., Wong, A. L., Rao, P., Huang, L., Dewhirst MW, et Sankar S. (2004). Functional significance of Tie2 signaling in the adult vasculature. *Recent Progress in Hormone Research*, 59, 51-71.
- Pettersson, A., Nagy, J. A., Brown, L. F., Sundberg, C., Morgan, E., Jungles, S., Carter R, Krieger JE, Manseau EJ, Harvey VS, Eckelhoefer IA, Feng D, Dvorak AM, Mulligan RC, et Dvorak HF. (2000). Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 80(1), 99-115.
- Pierrat, B., Correia, J. S., Mary, J. L., Tomás-Zuber, M., et Lesslauer, W. (1998). RSK-B, a novel ribosomal S6 kinase family member, is a CREB kinase under dominant control of p38alpha mitogen-activated protein kinase (p38alphaMAPK). *The Journal of Biological Chemistry*, 273(45), 29661-29671.
- Pietersma, A., Tilly, B. C., Gaestel, M., de Jong, N., Lee, J. C., Koster, J. F., et Sluiter W. (1997). p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 230(1), 44-48.
- Pietras, K., Pahler, J., Bergers, G., et Hanahan, D. (2008). Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS Medicine*, 5(1), e19.
- Pike, L. J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *Journal of Lipid Research*, 47(7), 1597-1598.
- Porras, A., Zuluaga, S., Black, E., Valladares, A., Alvarez, A. M., Ambrosino, C., Benito M, et Nebreda AR. (2004). P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Molecular Biology of the Cell*, 15(2), 922-933.
- Posas, F., et Saito, H. (1997). Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5319), 1702-1705.
- Potten, C. S. (1990). A comprehensive study of the radiobiological response of the murine (BDF1) small intestine. *International Journal of Radiation Biology*, 58(6), 925-973.
- Purhonen, S., Palm, J., Rossi, D., Kaskenpää, N., Rajantie, I., Ylä-Herttuala, S., Alitalo K, Weissman IL, et Salven P. (2008). Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to

## Références bibliographiques

---

vascular endothelium and are not needed for tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(18), 6620-6625.

Qiu, H., Edmunds, T., Baker-Malcolm, J., Karey, K. P., Estes, S., Schwarz, C., Hughes H, et Van Patten SM. (2003). Activation of human acid sphingomyelinase through modification or deletion of C-terminal cysteine. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(35), 32744-32752.

Qiu, W., Carson-Walter, E. B., Liu, H., Epperly, M., Greenberger, J. S., Zambetti, G. P., Zhang L, et Yu J. (2008). PUMA regulates intestinal progenitor cell radiosensitivity and gastrointestinal syndrome. *Cell Stem Cell*, 2(6), 576-583.

Quintern, L. E., Schuchman, E. H., Levrán, O., Suchi, M., Ferlinz, K., Reinke, H., Sandhoff K, et Desnick RJ. (1989). Isolation of cDNA clones encoding human acid sphingomyelinase: occurrence of alternatively processed transcripts. *The EMBO Journal*, 8(9), 2469-2473.

Quintern, L. E., Weitz, G., Nehrkorn, H., Tager, J. M., Schram, A. W., et Sandhoff, K. (1987). Acid sphingomyelinase from human urine: purification and characterization. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 922(3), 323-336.

Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J., et Davis RJ. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(13), 7420-7426.

Raingeaud, J., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Dérijard, B., et Davis, R. J. (1996). MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 16(3), 1247-1255.

Rak, J., Mitsuhashi, Y., Bayko, L., Filmus, J., Shirasawa, S., Sasazuki, T., et Kerbel RS. (1995). Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Research*, 55(20), 4575-4580.

Rak, J., et Yu, J. L. (2004). Oncogenes and tumor angiogenesis: the question of vascular "supply" and vascular "demand". *Seminars in Cancer Biology*, 14(2), 93-104.

Rao, B. G., et Spence, M. W. (1976). Sphingomyelinase activity at pH 7.4 in human brain and a comparison to activity at pH 5.0. *Journal of Lipid Research*, 17(5), 506-515.

## Références bibliographiques

---

- Rastinejad, F., Polverini, P. J., et Bouck, N. P. (1989). Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell*, 56(3), 345-355.
- Read, M. A., Whitley, M. Z., Gupta, S., Pierce, J. W., Best, J., Davis, R. J., et Collins T. (1997). Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(5), 2753-2761.
- Rebillard, A., Rioux-Leclercq, N., Muller, C., Bellaud, P., Jouan, F., Meurette, O., Jouan E, Vernhet L, Le Quément C, Carpinteiro A, Schenck M, Lagadic-Gossmann D, Gulbins E, Dimanche-et Boitrel MT. (2008). Acid sphingomyelinase deficiency protects from cisplatin-induced gastrointestinal damage. *Oncogene*, 27(51), 6590-6595.
- Reichel M. and S. J. Thannhauser (1940). Studies on animal lipids. xvii. the synthesis of lignocerylsphingosine fatty acid esters (sphingosine fats) and sphingosine amides (ceramides) ,*J. Biol. Chem.*, 135: 15-21.
- Reinehr, R., Becker, S., Eberle, A., Grether-Beck, S., et Häussinger, D. (2005). Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(29), 27179-27194.
- Reinhardt, H. C., Aslanian, A. S., Lees, J. A., et Yaffe, M. B. (2007). p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell*, 11(2), 175-189.
- Richards, S. A., Dreisbach, V. C., Murphy, L. O., et Blenis, J. (2001). Characterization of regulatory events associated with membrane targeting of p90 ribosomal S6 kinase 1. *Molecular and Cellular Biology*, 21(21), 7470-7480.
- Risau, W. (1995). Differentiation of endothelium. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(10), 926-933.
- Risau, W., et Lemmon, V. (1988). Changes in the vascular extracellular matrix during embryonic vasculogenesis and angiogenesis. *Developmental Biology*, 125(2), 441-450.
- Roccaro, A. M., Hideshima, T., Raje, N., Kumar, S., Ishitsuka, K., Yasui, H., Shiraishi N, Ribatti D, Nico B, Vacca A, Dammacco F, Richardson PG, et Anderson KC. (2006). Bortezomib mediates antiangiogenesis

## Références bibliographiques

---

- in multiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. *Cancer Research*, 66(1), 184-191.
- Romiti, E., Meacci, E., Tani, M., Nuti, F., Farnararo, M., Ito, M., et Bruni P. (2000). Neutral/alkaline and acid ceramidase activities are actively released by murine endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275(3), 746-751.
- Rosenfeldt, H. M., Hobson, J. P., Maceyka, M., Olivera, A., Nava, V. E., Milstien, S., et Spiegel S. (2001). EDG-1 links the PDGF receptor to Src and focal adhesion kinase activation leading to lamellipodia formation and cell migration. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(14), 2649-2659.
- Rossant, J., et Howard, L. (2002). Signaling pathways in vascular development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 18, 541-573.
- Rotolo, J. A., Zhang, J., Donepudi, M., Lee, H., Fuks, Z., et Kolesnick, R. (2005). Caspase-dependent and -independent activation of acid sphingomyelinase signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(28), 26425-26434.
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt T, et Nebreda AR. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*, 78(6), 1027-1037.
- Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., et Huot, J. (1997). p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene*, 15(18), 2169-2177.
- Rousseau, B., Larrieu-Lahargue, F., Bikfalvi, A., et Javerzat, S. (2003). Involvement of fibroblast growth factors in choroidal angiogenesis and retinal vascularization. *Experimental Eye Research*, 77(2), 147-156.
- Ruckhäberle, E., Rody, A., Engels, K., Gaetje, R., von Minckwitz, G., Schiffmann, S., Grösch S, Geisslinger G, Holtrich U, Karn T, et Kaufmann M. (2008). Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 112(1), 41-52.

## Références bibliographiques

---

- Ruhrberg, C., Gerhardt, H., Golding, M., Watson, R., Ioannidou, S., Fujisawa, H., Betsholtz C, et Shima DT. (2002). Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes et Development*, 16(20),
- Ruzinova, M. B., Schoer, R. A., Gerald, W., Egan, J. E., Pandolfi, P. P., Rafii, S., Manova K, Mittal V, et Benezra R. (2003). Effect of angiogenesis inhibition by Id loss and the contribution of bone-marrow-derived endothelial cells in spontaneous murine tumors. *Cancer Cell*, 4(4), 277-289.
- Sabourdy, F., Kedjouar, B., Sorli, S. C., Colié, S., Milhas, D., Salma, Y., et Levade T. (2008). Functions of sphingolipid metabolism in mammals--lessons from genetic defects. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1781(4), 145-183
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata M, Miyazono K, et Ichijo H. (1998). Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *The EMBO Journal*, 17(9), 2596-2606.
- Sakai, W., Swisher, E. M., Karlan, B. Y., Agarwal, M. K., Higgins, J., Friedman, C., Villegas E, Jacquemont C, Farrugia DJ, Couch FJ, Urban N, et Taniguchi T. (2008). Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature*, 451(7182), 1116-1120.
- Sakurai, T., He, G., Matsuzawa, A., Yu, G., Maeda, S., Hardiman, G., et Karin M. (2008). Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 alpha release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis. *Cancer Cell*, 14(2), 156-165.
- Sankaram, M. B., et Thompson, T. E. (1990). Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin. *Biochemistry*, 29(47), 10670-10675.
- Santana, P., Peña, L. A., Haimovitz-Friedman, A., Martin, S., Green, D., McLoughlin, M., Cordon-Cardo C, Schuchman EH, Fuks Z, et Kolesnick R (1996). Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell*, 86(2), 189-199.
- Sato, K., Malchinkhuu, E., Horiuchi, Y., Mogi, C., Tomura, H., Tosaka, M., Yoshimoto Y, Kuwabara A, et Okajima F. (2007). Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes. *Journal of Neurochemistry*.
- Sato, Y., Tsuboi, R., Lyons, R., Moses, H., et Rifkin, D. B. (1990). Characterization of the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: a self-regulating system. *The Journal of Cell Biology*, 111(2), 757-763.



## Références bibliographiques

---

- Sauro, H. M., et Kholodenko, B. N. (2004). Quantitative analysis of signaling networks. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 86(1), 5-43.
- Sawai, H., Domae, N., Nagan, N., et Hannun, Y. A. (1999). Function of the cloned putative neutral sphingomyelinase as lyso-platelet activating factor-phospholipase C. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(53), 38131-38139.
- Sawyers, C. L. (2003). Opportunities and challenges in the development of kinase inhibitor therapy for cancer. *Genes et Development*, 17(24), 2998-3010.
- Sawyers, C. (2004). Targeted cancer therapy. *Nature*, 432(7015), 294-297.
- Sawyers, C. L. (2008). The cancer biomarker problem. *Nature*, 452(7187), 548-552.
- Schissel, S. L., Keesler, G. A., Schuchman, E. H., Williams, K. J., et Tabas, I. (1998). The cellular trafficking and zinc dependence of secretory and lysosomal sphingomyelinase, two products of the acid sphingomyelinase gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(29), 18250-18259.
- Schissel, S. L., Schuchman, E. H., Williams, K. J., et Tabas, I. (1996). Zn<sup>2+</sup>-stimulated sphingomyelinase is secreted by many cell types and is a product of the acid sphingomyelinase gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(31), 18431-18436.
- Schuchman, E. H., Levrán, O., Pereira, L. V., et Desnick, R. J. (1992). Structural organization and complete nucleotide sequence of the gene encoding human acid sphingomyelinase (SMPD1). *Genomics*, 12(2), 197-205.
- Schuchman, E. H., Suchi, M., Takahashi, T., Sandhoff, K., et Desnick, R. J. (1991). Human acid sphingomyelinase. Isolation, nucleotide sequence and expression of the full-length and alternatively spliced cDNAs. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(13), 8531-8539.
- Schuller, B. W., Rogers, A. B., Cormier, K. S., Riley, K. J., Binns, P. J., Julius, R., Hawthorne MF et Coderre JA. (2007). No significant endothelial apoptosis in the radiation-induced gastrointestinal syndrome. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 68(1), 205-210.
- Schulze, H., Kolter, T., et Sandhoff, K. (2009). Principles of lysosomal membrane degradation Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1793(4), 674-683.

## Références bibliographiques

---

- Schwab, S. R., Pereira, J. P., Matloubian, M., Xu, Y., Huang, Y., et Cyster, J. G. (2005). Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5741), 1735-1739.
- Ségui, B., Andrieu-Abadie, N., Adam-Klages, S., Meilhac, O., Kreder, D., Garcia, V., Bruno AP, Jaffrézou JP, Salvayre R, Krönke M, et Levade T. (1999). CD40 signals apoptosis through FAN-regulated activation of the sphingomyelin-ceramide pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(52), 37251-37258.
- Semenza, G. L., & Wang, G. L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular and Cellular Biology*, 12(12), 5447-5454.
- Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 3(10), 721-732.
- Sennino, B., Falcón, B. L., McCauley, D., Le, T., McCauley, T., Kurz, J. C., Haskell A, Epstein DM, et McDonald DM. (2007). Sequential loss of tumor vessel pericytes and endothelial cells after inhibition of platelet-derived growth factor B by selective aptamer AX102. *Cancer Research*, 67(15), 7358-7367.
- Shaked, Y., Ciarrocchi, A., Franco, M., Lee, C. R., Man, S., Cheung, A. M., Hicklin DJ, Chaplin D, Foster FS, Benezra R, et Kerbel RS. (2006). Therapy-induced acute recruitment of circulating endothelial progenitor cells to tumors. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5794), 1785-1787.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., et Schuh AC. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376(6535), 62-66.
- Sharma, S. V., Gajowniczek, P., Way, I. P., Lee, D. Y., Jiang, J., Yuza, Y., Classon M, Haber DA, et Settleman J. (2006). A common signaling cascade may underlie "addiction" to the Src, BCR-ABL, and EGF receptor oncogenes. *Cancer Cell*, 10(5), 425-435.
- Shaw, A. S. (2006). Lipid rafts: now you see them, now you don't. *Nature Immunology*, 7(11), 1139-1142.
- Shchors, K., et Evan, G. (2007). Tumor angiogenesis: cause or consequence of cancer? *Cancer Research*, 67(15), 7059-7061.

## Références bibliographiques

---

- She, Q., Chandarlapaty, S., Ye, Q., Lobo, J., Haskell, K. M., Leander, K. R., DeFeo-Jones D, Huber HE, et Rosen N. (2008). Breast tumor cells with PI3K mutation or HER2 amplification are selectively addicted to Akt signaling. *PLoS One*, 3(8), e3065.
- Shen, J., Yang, X., Xiao, W., Hackett, S. F., Sato, Y., et Campochiaro, P. A. (2006). Vasohibin is up-regulated by VEGF in the retina and suppresses VEGF receptor 2 and retinal neovascularization. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(6), 723-725.
- Shida, D., Takabe, K., Kapitonov, D., Milstien, S., et Spiegel, S. (2008). Targeting SphK1 as a new strategy against cancer. *Current Drug Targets*, 9(8), 662-673.
- Shweiki, D., Neeman, M., Itin, A., et Keshet, E. (1995). Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(3), 768-772.
- Siekman, A. F., et Lawson, N. D. (2007). Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature*, 445(7129), 781-784.
- Siemann, D. W., et Rojiani, A. M. (2002). Enhancement of radiation therapy by the novel vascular targeting agent ZD6126. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 53(1), 164-171.
- Silva, L. C., de Almeida, R. F. M., Castro, B. M., Fedorov, A., et Prieto, M. (2007). Ceramide-domain formation and collapse in lipid rafts: membrane reorganization by an apoptotic lipid. *Biophysical Journal*, 92(2), 502-516.
- Simon, C. G., Holloway, P. W., et Gear, A. R. (1999). Exchange of C(16)-ceramide between phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 38(44), 14676-14682.
- Simon, M. C., et Keith, B. (2008). The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(4), 285-296.
- Simons, K., et Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), 569-572.
- Simons, K., et van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, 27(17), 6197-6202.
- Simons, K., et Vaz, W. L. C. (2004). Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 33, 269-295.

## Références bibliographiques

---

- Singer, S. J., et Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science (New York, N.Y.)*, 175(23), 720-731.
- Smith, E. L., et Schuchman, E. H. (2008). The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(10), 3419-3431.
- Soloaga, A., Thomson, S., Wiggin, G. R., Rampersaud, N., Dyson, M. H., Hazzalin, C. A., Mahadevan LC, et Arthur JS. (2003). MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *The EMBO Journal*, 22(11), 2788-2797.
- Sot, J., Bagatolli, L. A., Goñi, F. M., et Alonso, A. (2006). Detergent-resistant, ceramide-enriched domains in sphingomyelin/ceramide bilayers. *Biophysical Journal*, 90(3), 903-914.
- Soto, A. M., et Sonnenschein, C. (2004). The somatic mutation theory of cancer: growing problems with the paradigm? *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 26(10), 1097-1107.
- Soucek, L., Lawlor, E. R., Soto, D., Shchors, K., Swigart, L. B., et Evan, G. I. (2007). Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. *Nature Medicine*, 13(10), 1211-1218.
- Spence, M. W., Byers, D. M., Palmer, F. B., et Cook, H. W. (1989). A new Zn<sup>2+</sup>-stimulated sphingomyelinase in fetal bovine serum. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(10), 5358-5363.
- Spiegel, S., & Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(5), 397-407.
- Steck, T. L., Ye, J., et Lange, Y. (2002). Probing red cell membrane cholesterol movement with cyclodextrin. *Biophysical Journal*, 83(4), 2118-2125.
- Stein, B., Brady, H., Yang, M. X., Young, D. B., et Barbosa, M. S. (1996). Cloning and characterization of MEK6, a novel member of the mitogen-activated protein kinase kinase cascade. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(19), 11427-11433.
- Stephens, T. D., Bunde, C. J., et Fillmore, B. J. (2000). Mechanism of action in thalidomide teratogenesis. *Biochemical Pharmacology*, 59(12), 1489-1499.

## Références bibliographiques

---

- Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D. G., Cohen, P., et Gaestel, M. (1992). Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Letters*, 313(3), 307-313.
- Suchi, M., Dinur, T., Desnick, R. J., Gatt, S., Pereira, L., Gilboa, E., et Schuchman EH. (1992). Retroviral-mediated transfer of the human acid sphingomyelinase cDNA: correction of the metabolic defect in cultured Niemann-Pick disease cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(8), 3227-3231.
- Sunwoo, J. B., Chen, Z., Dong, G., Yeh, N., Crowl Bancroft, C., Sausville, E., Adams J, Elliott P, et Van Waes C. (2001). Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(5), 1419-1428.
- Suri, C., Jones, P. F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P. C., Davis, S., Sato TN, et Yancopoulos GD. (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, 87(7), 1171-1180.
- Taha, T. A., Kitatani, K., El-Alwani, M., Bielawski, J., Hannun, Y. A., et Obeid, L. M. (2006). Loss of sphingosine kinase-1 activates the intrinsic pathway of programmed cell death: modulation of sphingolipid levels and the induction of apoptosis. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(3), 482-484.
- Takabe, K., Paugh, S. W., Milstien, S., et Spiegel, S. (2008). "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacological Reviews*, 60(2), 181-195.
- Takekawa, M., Posas, F., et Saito, H. (1997). A human homolog of the yeast Ssk2/Ssk22 MAP kinase kinase kinases, MTK1, mediates stress-induced activation of the p38 and JNK pathways. *The EMBO Journal*, 16(16), 4973-4982.
- Tamura, K., Sudo, T., Senftleben, U., Dadak, A. M., Johnson, R., et Karin, M. (2000). Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell*, 102(2), 221-231.
- Taniike, M., Yamaguchi, O., Tsujimoto, I., Hikoso, S., Takeda, T., Nakai, A., Omiya S, Mizote I, Nakano Y, Higuchi Y, Matsumura Y, Nishida K, Ichijo H, Hori M, et Otsu K. (2008). Apoptosis signal-regulating

## Références bibliographiques

---

- kinase 1/p38 signaling pathway negatively regulates physiological hypertrophy. *Circulation*, 117(4), 545-552.
- Tanno, M., Bassi, R., Gorog, D. A., Saurin, A. T., Jiang, J., Heads, R. J., Martin JL, Davis RJ, Flavell RA, et Marber MS. (2003). Diverse mechanisms of myocardial p38 mitogen-activated protein kinase activation: evidence for MKK-independent activation by a TAB1-associated mechanism contributing to injury during myocardial ischemia. *Circulation Research*, 93(3), 254-261.
- Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T., et Nishida, E. (2000). A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature Cell Biology*, 2(2), 110-116.
- Teichgräber, V., Ulrich, M., Endlich, N., Riethmüller, J., Wilker, B., De Oliveira-Munding, C. C., van Heeckeren AM, Barr ML, von Kürthy G, Schmid KW, Weller M, Tümmler B, Lang F, Grassme H, Döring G, Gulbins E. (2008). Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nature Medicine*, 14(4), 382-391.
- Thannhauser S.J. and Reichel M. (1940). Studies on animal lipids. xvi. the occurrence of sphingomyelin as a mixture of sphingomyelin fatty acid ester and free sphingomyelin, demonstrated by enzymatic hydrolysis and mild saponification, *J. Biol. Chem.*, 135: 1-13.
- Thorpe, P. E. (2004). Vascular targeting agents as cancer therapeutics. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(2), 415-427.
- Tian, S., Hayes, A. J., Metheny-Barlow, L. J., et Li, L. (2002). Stabilization of breast cancer xenograft tumour neovasculature by angiopoietin-1. *British Journal of Cancer*, 86(4), 645-651.
- Tibbles, L. A., et Woodgett, J. R. (1999). The stress-activated protein kinase pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 55(10), 1230-1254.
- Tigyi, G., et Miledi, R. (1992). Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(30), 21360-21367.
- Timmerman, R. D. (2008). An overview of hypofractionation and introduction to this issue of seminars in radiation oncology. *Seminars in Radiation Oncology*, 18(4), 215-222.
- Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa O, Miyazono K, Noda T, et Ichijo H. (2001). ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Reports*, 2(3), 222-228.

## Références bibliographiques

---

- Tomiuk, S., Hofmann, K., Nix, M., Zumbansen, M., et Stoffel, W. (1998). Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(7), 3638-3643.
- Törocsik, B., et Szeberényi, J. (2000). Anisomycin uses multiple mechanisms to stimulate mitogen-activated protein kinases and gene expression and to inhibit neuronal differentiation in PC12 pheochromocytoma cells. *The European Journal of Neuroscience*, *12*(2), 527-532.
- Tozer, G. M., Kanthou, C., et Baguley, B. C. (2005). Disrupting tumour blood vessels. *Nature Reviews. Cancer*, *5*(6), 423-435.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille P, Brügger B, et Simons M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (New York, N.Y.)*, *319*(5867), 1244-1247.
- Trost, T. M., Lausch, E. U., Fees, S. A., Schmitt, S., Enklaar, T., Reutzel, D., Brixel LR, Schmidtke P, Maringer M, Schiffer IB, Heimerdinger CK, Hengstler JG, Fritz G, Bockamp EO, Prawitt D, Zabel BU, et Spangenberg C. (2005). Premature senescence is a primary fail-safe mechanism of ERBB2-driven tumorigenesis in breast carcinoma cells. *Cancer Research*, *65*(3), 840-849.
- Uemura, A., Ogawa, M., Hirashima, M., Fujiwara, T., Koyama, S., Takagi, H., Honda Y, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, et Nishikawa S. (2002). Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *The Journal of Clinical Investigation*, *110*(11), 1619-1628.
- Uhlik, M. T., Abell, A. N., Johnson, N. L., Sun, W., Cuevas, B. D., Lobel-Rice, K. E., Horne EA, Dell'Acqua ML, et Johnson GL. (2003). Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nature Cell Biology*, *5*(12), 1104-1110.
- Vadas, M., Xia, P., McCaughan, G., et Gamble, J. (2008). The role of sphingosine kinase 1 in cancer: oncogene or non-oncogene addiction? *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1781*(9), 442-447.
- Van Blitterswijk, W. J., van der Luit, A. H., Veldman, R. J., Verheij, M., et Borst, J. (2003). Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *The Biochemical Journal*, *369*(Pt 2), 199-211.
- Van Brocklyn, J. R., Lee, M. J., Menzeleev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O., Thomas DM, Coopman PJ, Thangada S, Liu CH, Hla T, et Spiegel S. (1998). Dual actions of sphingosine-1-phosphate:

## Références bibliographiques

---

extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *The Journal of Cell Biology*, 142(1), 229-240.

Van Brocklyn, J. R., Jackson, C. A., Pearl, D. K., Kotur, M. S., Snyder, P. J., et 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. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 64(8), 695-705.

Van Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P., et Angel, P. (1995). ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *The EMBO Journal*, 14(8), 1798-1811.

Van Helvoort, A., et Van Meer, G. (1995). Intracellular lipid heterogeneity caused by topology of synthesis and specificity in transport. Example: sphingolipids. *FEBS Letters*, 369(1), 18-21.

Van Meer, G. (2000). Cellular organelles: how lipids get there, and back. *Trends in Cell Biology*, 10(12), 550-552.

Van Meer, G., et Holthuis, J. C. (2000). Sphingolipid transport in eukaryotic cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1486(1), 145-170.

Van Meer, G., et Simons, K. (1982). Viruses budding from either the apical or the basolateral plasma membrane domain of MDCK cells have unique phospholipid compositions. *The EMBO Journal*, 1(7), 847-852.

Van Meer, G., et Liskamp, R. M. J. (2005). Brilliant lipids. *Nature Methods*, 2(1), 14-15.

Van Meer, G., Voelker, D. R., et Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(2), 112-124.

Veiga, M. P., Arrondo, J. L., Goñi, F. M., et Alonso, A. (1999). Ceramides in phospholipid membranes: effects on bilayer stability and transition to nonlamellar phases. *Biophysical Journal*, 76(1 Pt 1), 342-350.

Venkataraman, K., et Futerman, A. H. (2000). Ceramide as a second messenger: sticky solutions to sticky problems. *Trends in Cell Biology*, 10(10), 408-412.

Venkataraman, K., Lee, Y., Michaud, J., Thangada, S., Ai, Y., Bonkovsky, H. L., Parikh NS, Habrukowich C, et Hla T. (2008). Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circulation Research*, 102(6), 669-676.



## Références bibliographiques

---

- Venkataraman, K., Thangada, S., Michaud, J., Oo, M. L., Ai, Y., Lee, Y., Wu M, Parikh NS, Khan F, Proia RL, et Hla T. (2006). Extracellular export of sphingosine kinase-1a contributes to the vascular S1P gradient. *The Biochemical Journal*, 397(3), 461-471.
- Ventura, J. J., Tenbaum, S., Perdiguero, E., Huth, M., Guerra, C., Barbacid, M., Pasparakis M, et Nebreda AR. (2007). p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nature Genetics*, 39(6), 750-758.
- Verheij, M., Bose, R., Lin, X. H., Yao, B., Jarvis, W. D., Grant, S., Birrer MJ, Szabo E, Zon LI, Kyriakis JM, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, et Kolesnick RN. (1996). Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature*, 380(6569), 75-79.
- Verheul, H. M. W., et Pinedo, H. M. (2007). Possible molecular mechanisms involved in the toxicity of angiogenesis inhibition. *Nature Reviews. Cancer*, 7(6), 475-485.
- Visentin, B., Vekich, J. A., Sibbald, B. J., Cavalli, A. L., Moreno, K. M., Matteo, R. G., Garland WA, Lu Y, Yu S, Hall HS, Kundra V, Mills GB, et Sabbadini RA. (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(3), 225-238.
- Wagner, E. F., & Nebreda, A. R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews. Cancer*, 9(8), 537-549.
- Wallgard, E., Larsson, E., He, L., Hellström, M., Armulik, A., Nisancioglu, M. H., Genove G, Lindahl P, et Betsholtz C. (2008). Identification of a core set of 58 gene transcripts with broad and specific expression in the microvasculature. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(8), 1469-1476.
- Wang, F., Van Brocklyn, J. R., Hobson, J. P., Movafagh, S., Zukowska-Grojec, Z., Milstien, S., et Spiegel S. (1999). Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G(i)-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(50), 35343-35350.
- Wang, W., Chen, J. X., Liao, R., Deng, Q., Zhou, J. J., Huang, S., et Sun P. (2002). Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Molecular and Cellular Biology*, 22(10), 3389-3403.

## Références bibliographiques

---

- Wang, Y., Su, B., Sah, V. P., Brown, J. H., Han, J., et Chien, K. R. (1998). Cardiac hypertrophy induced by mitogen-activated protein kinase kinase 7, a specific activator for c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase in ventricular muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5423-5426.
- Waskiewicz, A. J., Flynn, A., Proud, C. G., et Cooper, J. A. (1997). Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *The EMBO Journal*, 16(8), 1909-1920.
- Waskiewicz, A. J., Johnson, J. C., Penn, B., Mahalingam, M., Kimball, S. R., et Cooper, J. A. (1999). Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 19(3), 1871-1880.
- Watanabe, K., Hasegawa, Y., Yamashita, H., Shimizu, K., Ding, Y., Abe, M., Ohta H, Imagawa K, Hojo K, Maki H, et Sonoda H, Sato Y. (2004). Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(7), 898-907.
- Watnick, R. S., Cheng, Y., Rangarajan, A., Ince, T. A., et Weinberg, R. A. (2003). Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis. *Cancer Cell*, 3(3), 219-231.
- Weinstein, I. B. (2000). Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis. *Carcinogenesis*, 21(5), 857-864.
- Weitz, G., Lindl, T., Hinrichs, U., et Sandhoff, K. (1983). Release of sphingomyelin phosphodiesterase (acid sphingomyelinase) by ammonium chloride from CL 1D mouse L-cells and human fibroblasts. Partial purification and characterization of the exported enzymes. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Für Physiologische Chemie*, 364(7), 863-871.
- Weston, C. R., et Davis, R. J. (2007). The JNK signal transduction pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(2), 142-149.
- Wiegmann, K., Schütze, S., Machleidt, T., Witte, D., et Krönke, M. (1994). Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell*, 78(6), 1005-1015.
- Wieland, F. T., Gleason, M. L., Serafini, T. A., et Rothman, J. E. (1987). The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *Cell*, 50(2), 289-300.
- Williams, S., Pettaway, C., Song, R., Papandreou, C., Logothetis, C., et McConkey, D. J. (2003). Differential effects of the proteasome inhibitor bortezomib on apoptosis and angiogenesis in human prostate tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2(9), 835-843.

## Références bibliographiques

---

- Wilson, E., Olcott, M. C., Bell, R. M., Merrill, A. H., et Lambeth, J. D. (1986). Inhibition of the oxidative burst in human neutrophils by sphingoid long-chain bases. Role of protein kinase C in activation of the burst. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(27), 12616-12623.
- Winkler, F., Kozin, S. V., Tong, R. T., Chae, S., Booth, M. F., Garkavtsev, I., Xu L, Hicklin DJ, Fukumura D, di Tomaso E, Munn LL, Jain RK. (2004). Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: Role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell*, 6(6), 553-563.
- Withers, H. R., & Elkind, M. M. (1970). Microcolony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa exposed to radiation. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine*, 17(3), 261-267.
- Wu, Y., Zhang, S., Kim, Y., Tan, H., Whiteman, M., Ong, C., Liu ZG, Ichijo H, et Shen HM. (2008). Signaling pathways from membrane lipid rafts to JNK1 activation in reactive nitrogen species-induced non-apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation*, 15(2), 386-397.
- Xia, P., Gamble, J. R., Wang, L., Pitson, S. M., Moretti, P. A., Wattenberg, B. W., D'Andrea RJ, et Vadas MA. (2000). An oncogenic role of sphingosine kinase. *Current Biology: CB*, 10(23), 1527-1530.
- Xia, P., Wang, L., Gamble, J. R., et Vadas, M. A. (1999). Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor-alpha inhibits apoptosis in human endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(48), 34499-34505.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J., et Greenberg, M. E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5240), 1326-1331.
- Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi T, Nishida E, Matsumoto K. (1995). Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5244), 2008-2011.
- Yang, D. D., Kuan, C. Y., Whitmarsh, A. J., Rincón, M., Zheng, T. S., Davis, R. J., Rakic P, et Flavell RA. (1997). Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature*, 389(6653), 865-870.
- Yao, B., Zhang, Y., Delikat, S., Mathias, S., Basu, S., et Kolesnick, R. (1995). Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase. *Nature*, 378(6554), 307-310.

## Références bibliographiques

---

- Yatomi, Y., Ruan, F., Hakomori, S., et Igarashi, Y. (1995). Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets. *Blood*, 86(1), 193-202.
- Yatomi, Y., Yamamura, S., Ruan, F., et Igarashi, Y. (1997). Sphingosine 1-phosphate induces platelet activation through an extracellular action and shares a platelet surface receptor with lysophosphatidic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(8), 5291-5297.
- Yoshinaga, K., Ito, K., Moriya, T., Nagase, S., Takano, T., Niikura, H., Yaegashi N, et Sato Y. (2008). Expression of vasohibin as a novel endothelium-derived angiogenesis inhibitor in endometrial cancer. *Cancer Science*, 99(5), 914-919.
- Zabrenetzky, V., Harris, C. C., Steeg, P. S., et Roberts, D. D. (1994). Expression of the extracellular matrix molecule thrombospondin inversely correlates with malignant progression in melanoma, lung and breast carcinoma cell lines. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 59(2), 191-195.
- Zanke, B. W., Boudreau, K., Rubie, E., Winnett, E., Tibbles, L. A., Zon, L., Kyriakis J, Liu FF, et Woodgett JR. (1996). The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Current Biology: CB*, 6(5), 606-613.
- Zhang, A. Y., Yi, F., Jin, S., Xia, M., Chen, Q., Gulbins, E., et Li PL. (2007). Acid sphingomyelinase and its redox amplification in formation of lipid raft redox signaling platforms in endothelial cells. *Antioxidants et Redox Signaling*, 9(7), 817-828.
- Zhang, H., Desai, N. N., Olivera, A., Seki, T., Brooker, G., et Spiegel, S. (1991). Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *The Journal of Cell Biology*, 114(1), 155-167.
- Zhang, Y., Yao, B., Delikat, S., Bayoumy, S., Lin, X. H., Basu, S., McGinley M, Chan-Hui PY, Lichenstein H, et Kolesnick R. (1997). Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase. *Cell*, 89(1), 63-72.
- Zhong, T. P., Childs, S., Leu, J. P., et Fishman, M. C. (2001). Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature*, 414(6860), 216-220.
- Zetter, B. R. (2008). The scientific contributions of M. Judah Folkman to cancer research. *Nature Reviews. Cancer*, 8(8), 647-654.

## Résumé :

Une irradiation unique à forte dose déclenche l'apoptose du compartiment microvasculaire via le couple sphingomyélinase acide/céramide, contrôlant l'ensemble du processus de destruction tissulaire.

Nous avons étudié la connexion entre cette apoptose contrôlée par l'ASMase et la capacité largement démontrée du céramide à induire la coalescence des microdomaines membranaires en larges plateformes. L'irradiation induit simultanément la voie de mort p38, dont l'inhibition protège partiellement les cellules endothéliales de la mort radio-induite. Enfin, la désorganisation des rafts par un agent dépléteur du cholestérol entrave l'activation de p38 et la mort des cellules microvasculaires qui en résulte.

Ces résultats suggèrent l'existence d'un mécanisme de mort émanant de la membrane spécifique aux cellules endothéliales irradiées, dans lequel la coalescence des rafts mène à l'activation de la voie de mort p38.

Nous avons ensuite utilisé la sphingosine-1-phosphate (S1P), un antagoniste du céramide, pour moduler cette vague précoce de mort radioinduite dans l'endothélium. Nous avons validé l'usage de la S1P comme agent systémique capable de limiter les défaillances aiguës survenant dans les organes suite à l'exposition à des stress sévères : l'injection de S1P abolit l'effondrement de l'endothélium et ainsi empêche la survenue du syndrome gastro-intestinal à 15 Gy, tout comme le choc septique induit par le LPS, un autre syndrome contrôlé par l'apoptose microvasculaire. Cette protection exercée par la S1P sur l'endothélium présente une double spécificité : les sphingolipides apparentés sont incapables d'induire un niveau de protection équivalent

de l'endothélium, et l'effet pro-survie de la S1P est dirigé uniquement vers l'endothélium et non vers les cellules épithéliales intestinales ou les lymphocytes. L'effet protecteur de la S1P est médié par les récepteurs couplés aux protéines G, puis les protéines pro-survie Akt, comme le prouvent l'inhibition de ces deux types de molécules qui, in vivo comme in vitro, supprime l'action de la S1P.

**Mots-clés :** radiation - endothélium - apoptose - céramide - sphingosine-1-phosphate - p38  
- Akt – radeaux membranaires

**Title :** Characterisation and modulation of early events controlling radioinduced death of microvascular endothelium

## Abstract :

High dose of ionizing radiation drives microvascular compartment to apoptosis, which controls the whole tissue damaging-process, through the acid sphingomyelinase (ASM)/ceramide pathway.

We addressed the connection between ASMase-induced apoptosis and the well-known capacity of ceramide to induce rafts microdomains coalescence into large platforms. Concomitantly to membrane remodeling, irradiation activated p38 death pathway and its blockade partially protected endothelial cells from radiation-induced death. Finally, disorganization of rafts by cholesterol-depletor hindered the p38 activation and the subsequent death-induced microvascular cells.

These results suggest a specific membrane controlled death mechanism in irradiated endothelial cells, where rafts coalescence leads to p38 activation and apoptosis. We then used sphingosine-1-phosphate (S1P), a ceramide antagonist, to modulate this early wave of radioinduced death in endothelium. We validated the pharmacological use of systemic S1P to restrain acute organ failure in response to severe stress: S1P injection abolished endothelial cells collapse and therefore prevented 15 Gy-induced gastrointestinal syndrome, as well as LPS-induced septic shock, another syndrome driven by microvascular apoptosis. This protection from S1P toward endothelium showed a dual specificity: related sphingolipids failed to offer the same protective effects, and this protection affected only endothelial cells as compared to intestinal epithelial cells or lymphocytes. S1P-induced protective effect is mediated through G-protein coupled receptor then the prosurvival protein Akt, as inhibition of both pathways suppresses the S1P action in vitro and in vivo.