Journal de la Société de Biologie, 193 (4), 429-437 (1999)

Rôle des seconds messagers lipidiques impliqués dans la réponse des cellules leucémiques aux médicaments anticancéreux

par Jean-Pierre Jaffrézou & Guy Laurent

E9910 INSERM, Institut Claudius Régaud, 20, rue Pont-Saint-Pierre, 31052 Toulouse.
jaffrezou@icr.fnclcc.fr

Reçu le 23 septembre

RÉSUMÉ

La simple observation clinique suggère que, si les agents anti-leucémiques sont aptes à éradiquer le compartiment des blastes en division terminale comme le montre le taux élevé de rémission complète (70 %) dans le cas de leucémie aiguë myéloïde ; ces agents sont cependant relativement inaptes à éliminer les cellules des compartiments précoces de la myélopoïèse leucémique comme le suggère le taux élevé de rechutes. Cette interprétation soulève le problème de la chimiorésistance naturelle des cellules composant les compartiments précoces de myélopoïèse leucémique. Au cours des dernières années, une série de travaux ont démontré qu'un même niveau de lésions était susceptible d'induire des effets cellulaires aussi variés qu'une mort rapide par apoptose, une mort reproductive différée ou un effet cytostatique transitoire. L'orientation de la réponse aux lésions est conditionnée par un réseau complexe et hautement régulé de signaux intracellulaire incluant des signaux de mort médiés par le céramide, et des signaux de survie médiés (au moins en partie) par le diacylglycérol et les phosphoinositide-3 phosphates. De la balance entre ces deux types de signalisation dépend la réponse cellulaire et la cytotoxicité. Ce constat ouvre de multiples voies de manipulation pharmacologique visant soit à favoriser la mort, soit à conférer une protection significative vis-à-vis des agents anticancéreux.

SUMMARY The role of lipid second messengers in the response of leukemic cells to anticancer drugs

Simple clinical observation suggests that while anti-leukemia agents are efficient at irradicating blasts cells in terminal division, as illustrated, in the case of acute myeloid leukemia, by the high complete remission rate (70 %) ; these agents are relatively inept at eliminating leukemic myeloid progenitors as suggested by the high level of recurrence. This interpretation underlines the apparently natural chimioresistance of cells which compose the myeloid leukemia progenitor compartment. Over the past few years, several studies have shown that similar cellular damage can lead to divers effects such as rapid apoptotic death, differed mitotic death, or a transitory cytostatic effect. Cell response to damage is regulated by a complex and highly regulated network of intracellular signals including cell death signals mediated by ceramide and cell survival signals mediated (at least in part) by diacylglycerol and phosphoinositide-3 phosphates. Cellular fate relies on the balance between these two signaling pathways. This hypothesis opens several prospects on pharmacological manipulation aimed at either favoring cell death or at conferring resistance to anti-cancer agents.

ORGANISATION DU CLÔNE LEUCÉMIQUE ET RÉSISTANCE NATURELLE DES PROGÉNITEURS LEUCÉMIQUES À LA CHIMIOTHÉRAPIE

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) se caractérisent par l'expansion clonale de cellules hématopoïétiques bloquées à un stade donné de la différenciation myéloïde. En dépit de leur uniformité apparente, les cellules de LAM sont hiérarchisées selon des modalités très proches de l'hématopoïèse normale (Sutherland *et al.*, 1996). En effet, on peut distinguer schématiquement : i) un compartiment minoritaire constitué de progéniteurs clonogènes doués de capacité de prolifération et d'autorenouvellement. Les cellules qui constituent ce compartiment présentent un phénotype très immature caractérisé

par l'expression de l'antigène CD34 et l'absence d'expression de l'antigène CD38 (CD34+ CD38–); ii) un compartiment plus mature qui dérive du précédent, constitué de cellules dites en division terminale, de phénotype CD38+ (Lapidot *et al.*, 1994). Ces cellules représentent l'immense majorité des cellules leucémiques présentes dans le sang et la moelle osseuse des patients.

La chimiothérapie d'attaque permet d'obtenir un taux élevé de réponses complètes (plus de 70 %); malheureusement, la survie des patients est fortement grevée par un taux élevé de rechutes (70 % à 2 ans), ces rechutes s'avérant le plus souvent réfractaires à toute thérapeutique. Ainsi, la simple observation clinique suggère que : i) la chimiothérapie est très efficace pour éradiquer le compartiment des cellules leucémiques en division terminale mais ses performances restent médiocres quant à l'élimination des progéniteurs leucémiques les moins différenciés; ii) les cellules leucémiques immatures expriment des mécanismes de résistance pléïotrope.

MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LA RÉSISTANCE NATURELLE DES CELLULES LEUCÉMIQUES IMMATURES À LA DAUNORUBICINE

Trois types de mécanisme peuvent limiter la cytotoxicité d'un médicament anti-cancéreux : i) des anomalies de transport du médicament diminuant sa concentration intracellulaire ou altérant sa distribution à l'intérieur de la cellule; ii) une diminution des lésions par la mise en jeu de processus de détoxication, des modifications qualitatives ou quantitatives de la cible, ou par une augmentation des capacités de réparation; iii) une tolérance aux lésions.

La daunorubicine (DNR) est une anthracycline massivement utilisée dans le traitement des leucémies aiguës myéloïdes. A ce titre, son mécanisme d'action est complexe et implique plusieurs effets dont la responsabilité respective dans la cytotoxicité du médicament reste encore imprécise. Ainsi, la DNR génère des radicaux libres oxygénés (RLO) à partir de son radical quinone sous l'influence de la NADPH oxydase; la DNR interagit avec la membrane et induit une peroxydation des lipides membranaires; la DNR s'intercale dans l'ADN et induit une distorsion de la double hélice; enfin, la DNR interagit avec la topoisomérase II nucléaire et fixe l'enzyme en situation covalente avec l'ADN avec, pour conséquence, la formation de coupures double-brin (Chabner et Collins, 1990).

A partir de modèles cellulaires représentatifs de l'hématopoïèse précoce (CD34+), nous avons caractérisé dans ces cellules plusieurs mécanismes de résistance vis-à-vis de la DNR impliquant des anomalies de transport, des processus de détoxication ou des anomalies de topoisomérase II. Ainsi, ces cellules expriment la P-glycoprotéine (P-gp) codée par le gène *mdr-1*; la P-gp joue le rôle de pompe transmembranaire et assure l'efflux actif de la DNR hors de la cellule (Bailly *et al.*, 1995). Ces cellules présentent également des anomalies de la distribution de la DNR, le médicament étant séquestré dans des structures vésiculaires puis éliminé selon un mécanisme encore inconnu (Lautier *et al.*, 1997). Par ailleurs, ces cellules présentent une augmentation des défenses anti-oxydatives (élévation du taux intracellulaire de glutathion, de thiorédoxine, de dismutase) assurant ainsi une protection vis-à-vis des radicaux oxygénés (résultats non publiés). Enfin, elles présentent des anomalies fonctionnelles de la topoisomérase II nucléaire caractérisées par une capacité accrue à réparer les coupures double brin (Chiron *et al.*, 1992).

Régulation négative de l'apoptose et résistance naturelle des cellules leucémiques immatures

Plus récemment, il a été observé que, si la DNR était susceptible d'induire un phénomène d'apoptose dans les cellules leucémiques matures (sensibles) telles que les cellules CD34-U937 et HL-60, elle était inapte à induire ce phénomène dans les cellules immatures (résistantes) telles que les cellules CD34+ KG1a, KG1 ou HEL. Cette résistance à l'apoptose n'est pas liée aux mécanismes de résistance précédemment caractérisés (Quillet-Mary *et al.*, 1996). Enfin, la résistance à l'apoptose est également vérifiée pour la plupart des agents susceptibles d'induire l'apoptose dans les cellules sensibles : médicaments anti-leucémiques (mitoxantrone, VP-16, aracytine), effecteurs solubles de l'immunité cellulaire (TNFα, agonistes de Fas, granzyme B) ou les rayonnements ionisants (pour revue, voir Jaffrézou *et al.*, 1998 *a*). Ces observations suggèrent que : i) la DNR active des signaux pro-apoptotiques dans les cellules matures (sensibles); ii) ces signaux sont bloqués dans les cellules immatures; iii) l'inhibition de l'apoptose contribue à la résistance naturelle des cellules immatures à la DNR. Sur la base de cette hypothèse, nous avons tenté de caractériser la nature des signaux impliqués dans l'apoptose induite par la DNR dans les cellules sensibles.

IMPLICATION DE LA VOIE SPHINGOMYÉLINE-CÉRAMIDE DANS L'APOPTOSE INDUITE PAR LA DNR DANS LES CELLULES SENSIBLES

En 1993, le groupe de Hannun montrait pour la première fois le rôle du céramide (CER) dans l'apoptose induite par le TNFα. Dans cette publication pionnière, les auteurs rapportent que, dans les cellules U937, le TNFα stimule une activité sphingomyélinase (SMase) responsable de l'hydrolyse de la SM et de la production de son catabolite immédiat, le CER; de plus, le traitement des cellules par un CER de synthèse rendu perméant par le raccourcissement de la chaîne carbonée (C2-CER) reproduit l'effet apoptotique du TNFα (Obeid *et al.*, 1993). Ces résultats suggéraient fortement que le CER endogène issu de l'hydrolyse de la SM était bien le médiateur de l'apoptose induite par le TNFα, et peut-être

par d'autres effecteurs cytotoxiques. De fait, en 1994, Haimovitz-Friedman *et al.* proposaient l'implication de cette voie de signalisation, dite « voie SM-CER » (ou encore cycle de la SM), dans l'apoptose induite par les rayonnements ionisants (RI) dans les cellules endothéliales (Haimovitz-Friedman *et al.*, 1994). De plus, nous avons démontré, pour la première fois, qu'un médicament anti-cancéreux, ici la DNR, était susceptible d'induire l'apoptose *via* le CER. En effet, la DNR, dans une gamme de concentrations où ce médicament induit l'apoptose (0,5-1 μM), active précocement (entre 4 et 10 minutes) un cycle (hydrolyse et resynthèse) de la SM avec génération concomitante de CER dans les cellules de LAM sensibles U937 et HL-60 (Jaffrézou *et al.*, 1996). Ces phénomènes n'ont pas été observés dans les cellules résistantes KG1a. Le rôle du CER dans l'apoptose induite par la DNR a été étayé par des études ultérieures démontrant que toute manipulation pharmacologique qui a pour résultat de bloquer la production de CER a pour conséquence d'inhiber l'apoptose (Mansat *et al.*, 1997 *a* ; Mansat *et al.*, 1997 *b*).

La production de CER induite par la DNR (comme le TNFα) stimule une SMase neutre magnésium-indépendante (N-SMase) alors que l'activité SMase acide (A-SMase) reste stable (Bettaïeb *et al.*, 1996 ; Jaffrézou *et al.*, 1996). De plus, la DNR active la production de CER dans des cellules génétiquement déficientes pour la SMase acide (Bezombes *et al.*, 1999). Enfin, le CER produit est entièrement issu de l'hydrolyse de la SM et ne provient pas de l'activation d'un processus de synthèse *de novo via* la stimulation de la céramide synthase (CER-synthase), mécanisme récemment proposé pour l'apoptose induite par le TNFα dans les cellules non hématopoïétiques (Xu *et al.*, 1998 ; Bourteele *et al.*, 1998). Ces résultats désignent la N-SMase comme l'effecteur clé de l'apoptose induite par la DNR.

Le fait que la production de CER soit observée dans un délai de 4 à 10 minutes alors que l'apoptose n'est détectable que dans un délai de 4 à 6 heures a soulevé des controverses quant à l'implication de la voie SM-CER dans l'apoptose induite par la DNR. Pour cette raison, nous avons évalué soigneusement l'influence de la DNR sur le métabolisme de la SM sur une plus longue période (0-4 heures). Dans cette étude, nous observons que la DNR stimule au moins 4 cycles de la SM avec production concomitante de CER (Jaffrézou *et al.*, 1998*b*). Ces vagues successives de production de CER précèdent les étapes terminales de l'apoptose, dans l'ordre : clivage de la PARP (observé à 4 heures), fragmentation de l'ADN et modifications morphologiques (observées à 6 heures). Dans cette même étude, nous avons observé qu'un CER perméant était capable de stimuler la N-SMase et l'hydrolyse de la SM. Ce résultat suggère que le CER produit par la DNR lors du premier cycle active un phénomène d'autoproduction, et que les pics successifs de CER ont pour effet de maintenir « une pression de signalisation » nécessaire pour induire l'apoptose (Jaffrézou *et al.*, 1998 *b*). Ces données soulignent plus encore le rôle du CER dans l'apoptose induite par la DNR. Le rôle critique du CER a été ultérieurement étendu à d'autres effecteurs cytotoxiques incluant d'autres médicaments anti-cancéreux (mitoxantrone, vincristine, aracytine), les RI et les agonistes de Fas (pour revue, voir Levade *et al.*, 1996).

Caractérisation des cibles protéiques du céramide produit par la DNR

De nombreuses études suggérant le rôle du CER dans l'apoptose induite par les effecteurs cytotoxiques, les chercheurs se sont attachés à caractériser les cibles protéiques impliquées dans l'effet apoptotique du CER. Le CER active plusieurs kinases ou phosphatases : la "Ceramide-Activated Protein Kinase" (CAPK) responsable de l'activation du module Raf-1/ERK, une « Ceramide-Activated Protein Phosphatase » (CAPP) dont le rôle reste obscur, et MEKK1 responsable de l'activation du module SEK1/JNK/AP-1. En utilisant des dominants négatifs de ces diverses protéines, le groupe de R. Kolesnick a élégamment démontré que l'activation du module JNK/AP-1 (et non l'activation du module Raf-1/ERK) était essentielle pour l'effet apoptotique du CER (Verheij *et al.*, 1996). De plus, nous avons montré que, dans les cellules traitées par la DNR : i) le CER issu de l'hydrolyse de la SM active bien le module JNK/AP-1 ; ii) l'activation de JNK par la DNR est régulée par un mécanisme redox-dépendant ; iii) toute manipulation pharmacologique ayant pour conséquence de bloquer l'activation de JNK a pour effet de bloquer l'apoptose induite par la DNR (Quillet-Mary *et al.*, 1997 ; Mansat-DeMas *et al.*, 1999). Ces résultats confirment l'implication du module JNK/AP-1 dans l'apoptose induite par la DNR. Cette observation n'est pas restreinte à la DNR. En effet, le module JNK/AP-1 est également impliqué dans l'apoptose induite par la plupart des agents génotoxiques (pour *revue*, voir Kyriakis & Avruch, 1996).

Régulation de la production de céramide

Dans la mesure où la concentration intracellulaire de CER apparaît comme un paramètre critique pour la viabilité cellulaire, on conçoit que tout mécanisme qui participe à la régulation de sa production devrait fortement influencer la réponse apoptotique à la DNR. La production de CER est fonction de deux paramètres : d'une part l'amplitude et la durée de la stimulation de l'activité SMase, d'autre part la quantité de SM disponible pour l'hydrolyse.

Ainsi, l'activité N-SMase est régulée par l'activité de la protéine kinase C (PKC). En effet, les inhibiteurs de la PKC stimulent l'activité N-SMase (Chmura *et al.*, 1996). A l'inverse, nous avons montré que la stimulation de la PKC par les esters de phorbol ou la phosphatidylsérine inhibe la stimulation de la N-SMase, la production de CER et l'apoptose induite par la DNR (Mansat *et al.*, 1997*a*). L'ensemble de ces travaux suggèrent que la stimulation de la N-SMase implique des phénomènes de déphosphorylation en rapport avec l'activation de sérine/thréonine phosphatases. L'activité N-SMase est également régulée par la balance oxydative. En effet, la

DNR stimule la production précoce (dès 5 minutes) de radicaux libres oxygénés (RLO) et les anti-oxydants (N-acétylcystéine et PDTC) non seulement bloquent l'accumulation de RLO mais aussi inhibent la stimulation de l'enzyme par la DNR (Mansat-De Mas *et al.,* 1999). Enfin, l'activité N-SMase est régulée par certaines tyrosine kinases de la famille src. En effet, des inhibiteurs de src tels que l'herbimycine bloquent la stimulation de la N-SMase par la DNR (résultats non publiés). Ainsi, la production de CER (et donc l'apoptose) induite par la DNR est régulée par au moins 3 paramètres : l'activité de certaines isoformes de la PKC, l'activité de certaines src kinases et la production de RLO.

La quantité de SM hydrolysable est un autre paramètre susceptible de réguler la production de CER. En effet, il a été montré que la SM hydrolysable est principalement contenue dans le feuillet interne de la membrane plasmique (Linardic *et al.*, 1994 ; Andrieu *et al.*, 1996). Ce pool de SM est minoritaire puisque la SM est habituellement distribuée essentiellement dans le feuillet externe de la membrane plasmique (asymétrie transverse de la SM) (pour revue, voir Devaux, 1991). Il est légitime de concevoir que toute modification de l'asymétrie transverse ayant pour conséquence de réduire le pool interne de SM aura pour conséquence de réduire la production de CER. En effet, certaines cellules naturellement résistantes à la DNR présentaient un tel mécanisme de protection avec une distribution de la SM largement à l'avantage du feuillet externe de la membrane plasmique ; la nature de la translocase responsable de la réduction du pool interne reste à déterminer mais certains arguments plaident en faveur du rôle joué par la P-glycoprotéine (Bettaïeb *et al.*, 1996 ; Bezombes *et al.,* 1998).

Régulation du métabolisme du céramide

La concentration intracellulaire de CER peut être aussi efficacement régulée par son métabolisme. Plusieurs voies métaboliques, toutes concourant à la réduction de la concentration intracellulaire de CER, sont possibles : i) le CER peut être utilisé pour resynthétiser la SM sous l'effet d'une SM synthase ; ii) le CER peut être dégradé par une céramidase en sphingosine, laquelle peut être transformée en sphingosine 1-phosphate (SPP) ; iii) enfin, le céramide peut être transformé en glucosylcéramide, métabolite dépourvu d'effet apoptotique, par la glucosylcéramide synthase.

Le CER peut être transféré sur la phosphocholine pour former de la SM sous l'effet de la SM synthase. De fait, ce mécanisme est mis en jeu lors du cycle de resynthèse de la SM (voir plus haut). Ainsi, toute stimulation de la SM synthase aura pour effet de diminuer la concentration intracellulaire de CER. La régulation de la SM synthase est mal connue. Toutefois, certains chercheurs ont suggéré le rôle de la PKC dans la régulation de l'activité SM synthase (Hampton *et al.*, 1989).

Le CER peut être catabolisé par une céramidase (la mieux connue étant la céramidase lysosomale) en sphingosine. Ce médiateur lipidique a été impliqué dans certains types d'apoptose. Toutefois, nous avons observé que la DNR est parfaitement apte à induire l'apoptose dans des cellules où la céramidase lysosomale est génétiquement déficiente (cellules dérivées de maladie de Farber) (Ségui *et al.*, 1999). Sans exclure le rôle potentiel d'autres voies de production de la sphingosine sous l'effet par exemple de céramidases extralysosomales (Coroneos *et al.*, 1995), nos résultats suggèrent que le rôle intrinsèque de la sphingosine dans l'apoptose induite par la DNR est modeste. Par contre, la sphingosine peut être convertie en un médiateur régulateur potentiellement plus puissant, la sphingosine-1-phosphate (SPP), sous l'effet d'une sphingosine kinase. En effet, la SPP, connue de longue date comme un médiateur mitogénique, a été plus récemment caractérisée comme un puissant inhibiteur de l'apoptose induite par le CER ou par des agonistes de la voie SM-CER (Cuvillier *et al.*, 1996 ; Cuvillier *et al.*, 1998 ; Kleuser *et al.*, 1998). De plus, la SPP bloque l'apoptose induite par les anthracyclines (Perez *et al.*, 1997). Le mécanisme par lequel la SPP bloque l'apoptose est indéterminé. Toutefois, il a été montré que la SPP inhibe l'activation du module JNK/AP-1 impliqué dans l'apoptose induite par le CER (voir plus haut) ainsi que l'activation des caspases (Cuvillier *et al.*, 1996 ; Cuvillier *et al.*, 1998). De plus, la SPP stimule des voies de signalisation impliquées dans la survie, incluant la voie des MAP kinases et la phosphoinositide 3-kinase (Rakhit *et al.*, 1999). La sphingosine kinase est fortement régulée par l'activité PKC (Mazurek *et al.*, 1994 ; Buehrer *et al.,* 1996 ; Cuvillier *et al.*, 1996). Enfin, l'existence d'une phosphatase maintenant l'équilibre entre SPP et CER a été récemment proposée (Mandala *et al.*, 1998).

Enfin, le CER peut être converti en glucosylcéramide (Glc-CER) par une Glc-CER synthase. Contrairement au CER, le Glc-CER n'a pas d'effet cytotoxique ; bien plus, il pourrait avoir un effet stimulant sur la prolifération (Shayman *et al.*, 1991). On conçoit donc que cette enzyme participe à la protection cellulaire. De fait, il est connu que les inhibiteurs de la Glc-CER synthase (ex : D-PDMP) altèrent le cycle cellulaire et présentent une activité anti-tumorale significative (Abe *et al.*, 1995 ; Rani *et al.*, 1995). De plus, il a été montré que l'activité de la Glc-CER synthase est fortement stimulée dans les cellules rendues résistantes aux anthracyclines par sélection (cellules MDR) et que certains agents connus pour inhiber la résistance MDR sensibilisaient ces cellules en inhibant l'activité de cette enzyme (Lavie *et al.,* 1997). Bien que l'implication de la PKC dans la régulation de la Glc-CER n'ait pas été documentée à ce jour, il est tentant d'établir dans les cellules MDR un parallélisme entre, d'une part, la stimulation de cette enzyme et, d'autre part, la stimulation dûment documentée de la PKC dans ces cellules. Enfin, plus récemment, il a été montré que la surexpression de la Glc-CER synthase confère une très forte protection vis-à-vis des anthracyclines (Liu *et al.*, 1999). L'ensemble des ces données suggère que : i) la Glc-CER synthase joue un rôle considérable dans la réponse apoptotique aux anthracyclines en régulant l'équilibre CER/Glc-CER ; ii) l'activité de la Glc-CER synthase est peut-être régulée par l'activité PKC.

Au total, il apparaît que la concentration intracellulaire de CER est très efficacement régulée tant au niveau de la production de CER qu'au niveau de son métabolisme. Tout phénomène ayant pour conséquence de limiter la stimulation de la N-SMase, de diminuer la quantité de SM hydrolysable ou d'accélérer la conversion métabolique du CER par stimulation de la SM synthase, de la sphingosine kinase ou de la Glc-CER synthase, tendrait à diminuer la concentration intracellulaire de CER et, par ce biais, de limiter la cytotoxicité de la DNR. L'équilibre métabolique entre le CER, messager de mort, et ses métabolites (Glc-CER et SPP), médiateurs anti-apoptotiques, a fait proposer par le groupe de S. Spiegel le terme de « rhéostat sphingolipidique » régulé en la circonstance par la sphingosine kinase et la Glc-CER synthase (voir Fig. 1).

Implication des mécanismes régulateurs dans la résistance naturelle des cellules leucémiques immatures à la DNR

En comparant cellules sensibles matures (U937 et HL-60) et cellules résistantes immatures (KG1a), nous observons, dans les cellules résistantes, la réalité de ces paramètres régulateurs. En effet, les cellules KG1a se caractérisent par une réduction du pool de SM hydrolysable (Bettaïeb *et al.*, 1996). De plus, après exposition aux effecteurs cytotoxiques, nous observons non seulement l'absence de production de CER en rapport avec un défaut de stimulation de la SMase neutre (Bezombes *et al.*, 1998) mais, au contraire, une diminution de la concentration de CER en rapport avec une stimulation de la SM synthase (Bettaïeb *et al.*, 1996). Il est bien entendu possible que ces cellules présentent une activation constitutive de la sphingosine kinase ou de la Glc-CER synthase. Il est intéressant de souligner que les cellules KG1a présentent une activité PKC basale 5 fois supérieure à celle des cellules sensibles U937.

En résumé, il ressort de ces observations que, si le CER apparaît bien comme un médiateur de mort, sa concentration intracellulaire est éminemment régulée par des processus métaboliques complexes intervenant soit au niveau de sa production, soit au niveau de son métabolisme.

Dans ces phénomènes régulateurs, la PKC joue un rôle critique. En effet, comme décrit ci-dessus, la stimulation de l'activité PKC : i) inhibe la production de CER en limitant l'activité SMase neutre ; ii) elle favorise le métabolisme du CER en stimulant la sphingosine 1 kinase et, peut-être, la SM synthase et la Glc-CER synthase.

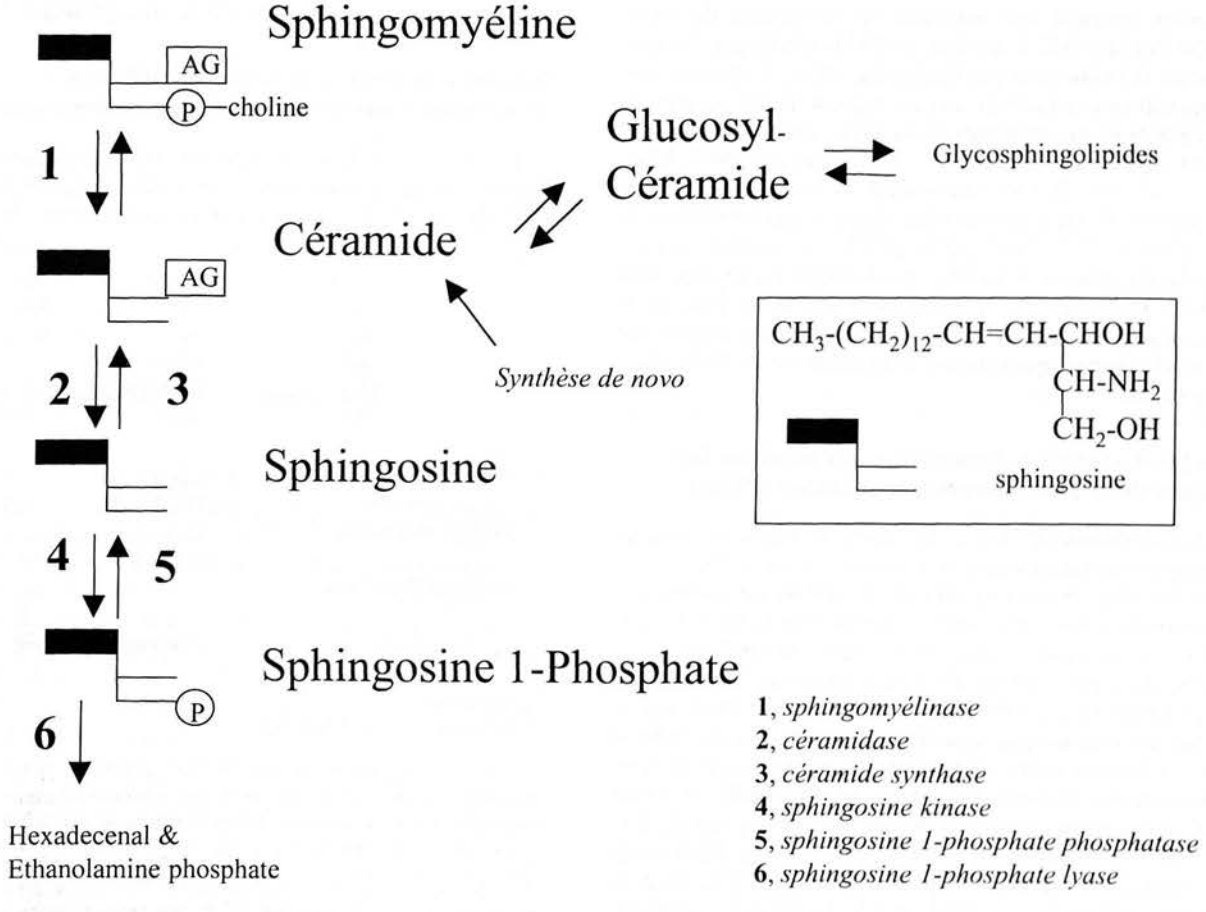

FIG. 1. – Voies métaboliques des sphingolipides.

De ce constat, il découle que toute stimulation de la PKC par des signaux extracellulaires (intégrines, facteurs de croissance), par des signaux intracellulaires (produits oncogéniques) ou par des voies de signalisation activées par le médicament lui-même, devrait conduire à limiter la concentration intracellulaire de CER.

La DNR stimule la production de DAG

Dans un travail récent, nous avons montré que la DNR pouvait stimuler la production de DAG dans une gamme de doses comprises entre 0,1 et 1 µM. En théorie, celui-ci pourrait provenir de trois sources différentes : i) de l'hydrolyse des phosphoinositides (PIP2) sous l'effet d'une phosphoinositol-phospholipase C, ii) de la conversion de l'acide phosphatidique (AP) produit par l'activation d'une phospholipase D (PLD), iii) enfin de l'hydrolyse de la phosphatidylcholine (PC) sous l'effet d'une phospholipase C spécifique de la PC (PC-PLC). Cette dernière hypothèse est la plus probable, compte tenu que : i) il n'existe aucun argument en faveur de l'activation d'une PLD (pas de libération de choline ou de AP); ii) la DNR produit en parallèle DAG et phosphocholine; iii) la production de DAG est entièrement bloquée par le D609, un inhibiteur considéré comme spécifique de la PC-PLC. De plus, le blocage de la production de DAG augmente la cytotoxicité de la DNR. Ce résultat suggère une fonction de protection du DAG libéré par la DNR. Les cibles du DAG libéré par l'hydrolyse de la PC ne sont pas toutes élucidées. Toutefois, certains travaux suggèrent que ce type de DAG active des isoformes dites atypiques de la PKC telles que les PKC ζ et ι (Bjorkoy *et al.*, 1995; van Dijk *et al.*, 1997, Moscat *et al.*, 1997). Fait intéressant, le blocage de la production de DAG diminue mais n'abolit pas totalement la stimulation de la PKC par la DNR. Ce résultat suggère que la stimulation de la PKC par la DNR est régulée seulement en partie par le DAG issu de l'hydrolyse de la PC, et qu'il existe donc d'autres médiateurs libérés par la DNR et impliqués dans l'activation de la PKC (Bettaïeb *et al.*, 1999).

La DNR stimule la production des produits lipidiques de la phosphoinositide-3 kinase (PI3K)

Les produits lipidiques de la PI3K peuvent stimuler certaines isoformes dites « nouvelles » de la PKC telles que les PKC δ, ε, η (Toker *et al.*, 1994) ou encore des isoformes dites « atypiques » telles que la PKC ζ et la PKC ι (Nakanishi *et al.*, 1993). Ainsi, la DNR active la PI3K dans une gamme de doses comprises entre 0,1 et 1 µM (Plo *et al.*, 1999). L'activation de la PI3K par la DNR est inhibée par la wortmannine (WM) (la WM se fixe à la sous-unité catalytique p110 de façon irréversible) et par un autre inhibiteur, le LY294002 (LY) (le LY agit comme inhibiteur compétitif pour le site de liaison de l'ATP sur la PI3K) (Uli *et al.*, 1995). Trois types d'arguments étayent l'implication de la PI3K dans la survie cellulaire : i) WM et LY facilitent l'apoptose induite par la DNR; ii) la transfection d'un dominant négatif de la sous-unité régulatrice p85 (Δp85) a un effet similaire; iii) la transfection d'un dominant positif de p110 (p110*) inhibe l'apoptose induite par la DNR (résultats non publiés). La fonction protectrice de la PI3K ne semble pas restreinte à la DNR. En effet, la stimulation de cette enzyme confère aussi une protection vis-à-vis des rayonnements ionisants et UV (Price *et al.*, 1996; Kulik *et al.*, 1997).

Au total, ces résultats montrent que la DNR active simultanément la production d'un messager de mort (le CER) et de plusieurs messagers de survie (DAG et produits lipidiques de la PI3K). Il existe donc une balance entre ces deux types de signalisation, et de l'équilibre entre ces voies dépend la réponse cellulaire. Ce constat évoque l'existence d'un dialogue entre voies de mort et voies de survie. On peut considérer que les messagers de survie interfèrent avec la voie de mort en stimulant l'activité PKC, laquelle, nous l'avons vu, régule à plusieurs niveaux la production et le métabolisme du CER (voir Fig. 2).

Si, en effet, l'activité de phospholipases telles que la PC-PLC ou de lipides kinases telles que la PI3K sont impliquées dans la régulation négative de l'apoptose chimio-induite, ceci présenterait de multiples perspectives compte tenu du statut et de la fonction de ces protéines dans la transformation cellulaire. En effet, ces protéines ont en commun le fait d'être activées par de nombreux facteurs de croissance et produits oncogéniques.

Facteurs de croissance hématopoïétiques et résistance aux médicaments anti-leucémiques

La PC-PLC et la PI3K sont activées par de nombreux facteurs de croissance hématopoïétiques (FCH) incluant soit des cytokines se liant à des récepteurs tyrosine

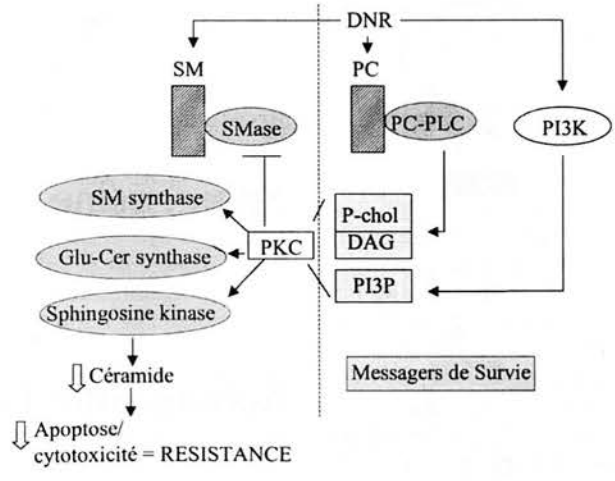

FIG. 2. – Hypothèse de travail : Mécanisme de la protection; défaut de production de céramide et/ou accélération du métabolisme du céramide conférée par le DAG et les PI3P. (DNR, daunorubicine; SM, sphingomyéline, PC, phosphatidylcholine; PC-PLC, phospholipase C; SMase, sphingomyélinase; DAG, diacylglycérol; P-chol, phosphocholine; PKC, protéine kinase C; Glu-CER, glucosylcéramide; PI3K, phosphoionisitide 3-Kinase; PI3P, phosphoinositides 3-phosphates).

kinase (le ligand de c-Kit ou Stem Cell Factor, le ligand de Flt-3), soit des cytokines se liant à des récepteurs de la superfamille des cytokines (l'IL3, le GM-CSF, l'IL1, l'EPO) (Rao *et al.*, 1994 ; Rao *et al.*, 1995 ; Sato *et al.*, 1993 ; Rottapel *et al.*, 1994 ; Anderson *et al.*, 1997 ; Sattler *et al.*, 1997). Ces FCH sont souvent produits par voie autocrine par les cellules leucémiques, notamment par les cellules leucémiques immatures (Del Canizo *et al.*, 1998). La production de ces FCH confère une autonomie de croissance aux cellules leucémiques *in vitro* et cette particularité a une traduction péjorative quant à la réponse thérapeutique (Hunter *et al.*, 1993 ; Löwenberg *et al.*, 1993). Nous pouvons donc imaginer que la stimulation durable de la PC-PLC et/ou de la PI3K par des FCH a pour conséquence de générer des médiateurs (DAG et/ou PI-3P) capables d'interférer avec la voie SM-CER *via* la PKC. Cette hypothèse est renforcée par des études antérieures qui montrent d'une part que les FCH protègent les cellules leucémiques de l'apoptose induite par les médicaments anti-cancéreux (Lotem *et al.*, 1992 ; Kaplinski *et al.*, 1996) et, d'autre part, que les inhibiteurs de la PKC sensibilisent à la DNR les cellules leucémiques de patients cultivées en présence de FCH (Laredo *et al.*, 1994).

Variants oncogéniques et résistance aux médicaments anti-leucémiques

La PC-PLC et la PI3K sont activées par des variants actifs de produits oncogéniques tels que p21Ras ou bcr-abl (Diaz-Laviada *et al.*, 1990, Rodriguez-Viciana *et al.*, 1997 ; Skorski *et al.*, 1997). Dans 20-40 % des LAM, H-Ras est muté. La mutation de Ras est aussi un facteur péjoratif de réponse thérapeutique. Nous pouvons donc également imaginer que des variants actifs de Ras facilitent la production de médiateurs tels que le DAG et/ou les PI-3P susceptibles d'interférer avec la réponse apoptotique *via* leur effets sur le métabolisme des sphingolipides.

CONCLUSION

L'ensemble de ces travaux montrent que les cellules leucémiques immatures sont constitutivement pourvues de multiples mécanismes de protection vis-à-vis d'une série d'effecteurs cytotoxiques (médicaments anti-leucémiques, rayonnements ionisants, cytokines). Ces mécanismes de protection font appel soit à des anomalies de transport, soit à des modifications de la cible, soit à une régulation négative de l'apoptose. Ces résultats peuvent expliquer la résistance naturelle des cellules leucémiques immatures et ouvrent de nombreux champs d'application en terme de manipulation pharmacologique.

Par ailleurs, en référence aux travaux réalisés avec les rayonnements ionisants, l'inhibition des signaux de mort cellulaire normalement activés par l'induction de dommages de l'ADN, pourrait avoir d'importantes conséquences mutagènes. Cette hypothèse revient à postuler que les cellules de l'hématopoïèse leucémique précoce présentent constitutivement ce qu'il conviendrait de nommer au sens large un « phénotype mutateur », ce qui ouvre une nouvelle perspective exploitable dans un futur proche.

Remerciements. – Ces recherches ont bénéficié du soutien de La Ligue Nationale Contre le Cancer (J. P. J.), La Faculté de Médecine Toulouse-Rangueil (G. L.), l'Association pour la Recherche sur le Cancer Grants 9296 (G. L.), et 9788 (J. P. J.), et le Centre National d'Etude Spatiale (J. P. J.).

BIBLIOGRAPHIE

Abe A., Radin N. S., Shayman J. A., Wotring L. L., Zipkin R. E., Sivakumar R, Ruggieri J. M., Carson K. G. & Ganem B., Structural and stereochemical studies of potent inhibitors of glucosylceramide synthase and tumor cell growth. *J. lipid. Res.*, 1995, *36*, 611-621.

Anderson S. M., Burton E. A. & Koch B. L., Phosphorylation of CBL following stimulation with interleukin-3 and its association with Grb2, Fyn, and phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 739-745.

Andrieu N., Salvayre R. & Levade T., Comparative study of the metabolic pools of sphingomyelin and phosphatidylcholine sensitive to tumor necrosis factor. *Eur J Biochem.*, 1996, *236*, 738-745.

Bailly J. D., Muller C, Jaffrézou J. P., Demur C., Cassar G., Bordier C. & Laurent G., Lack of correlation between expression and function of P-glycoprotein in acute myeloid leukemic cells. *Leukemia*, 1995, *9*, 799-807.

Bettaïeb A., Record M., Côme M. G., Bras A. C., Chap H., Laurent G. & Jaffrézou J. P., Opposite effects of TNFa on the sphingomyelin-ceramide pathway in TNFa-resistant and sensitive myeloid leukemia cell lines: role of transverse sphingomyelin distribution in the plasma membrane. *Blood*, 1996, *88*, 1465-1472.

Bettaïeb A., Plo I., Mansat V., Quillet-Mary A., Levade T., Laurent G. & Jaffrézou J. P., Intracellular diacylglycerol modulates ceramide-mediated apoptosis triggered by daunorubicin and mitoxantrone. *Mol. Pharmacol.*, 1999, *55*, 118-125.

Bezombes C., Maestre N., Laurent G., Levade T., Bettaïeb A. & Jaffrézou J. P., Restoration of TNFα-induced ceramide generation and apoptosis in resistant human leukemia KG1a cells by the P-glycoprotein blocker PSC833. *FASEB J.*, 1998, *12*, 101-109.

Bezombes C., Uro-Coste E., Bruno A., Ségui B., Andrieu-Abadie N., Laurent G. & Jaffrézou J. P., Acid sphingomyelinase is not sollicited for ceramide generation and apoptosis triggered by TNFα, CD95, CD40, daunorubicin, and ionizing radiations. *Exp. Cell Res.* (en révision).

Bjorkoy G., Overvathn A., Diaz-Meco M. T., Moscat J. & Johansen T., Evidence for a bifurcation of the mitogenic signaling pathway activated by Ras and phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C. *J. Biol. Chem.*, 1995, *270*, 21299-21306.

Bourteele S., Hauber A., Döppler H., Horn-Müller J., Röpke C., Schwarzmann G., Pfizenmaier K. & Müller G., Tumor necrosis factor induces ceramide oscillations and negatively controls sphingolipid synthases by caspases in apoptotic Kym-1 cells. *J. Biol. Chem.*, 1998, *273*, 31245-31251.

Buehrer B. M., Bardes E. S. & Bell R. M., Protein kinase C-dependent regulation of human erythroleukemia (HEL) cell sphingosine kinase activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, *1303*, 233-242.

Chabner B. A. & Collins J. M., Cancer Chemotherapy. Principles and Practice. JB Lippincott Company, Philadelphia, 1990.

Chiron M., Demur C., Pierson V., Jaffrézou J. P., Muller C., Sai-

vin S., Bordier C., Bousquet C. & Laurent G., Sensitivity of fresh acute myeloid leukemia cells to etoposide : Relationship with cell growth characteristics and DNA cleavage. *Blood,* 1992, *80*, 209-216.

Chmura S. J., Nodzenski E., Weichselbaum R. R. & Quintans J., Protein kinase C inhibition induces apoptosis and ceramide production through activation of a neutral sphingomyelinase. *Cancer Res.*, 1996, *56*, 2711-2714.

Coroneos E., Martinez M., McKenna S. & Kester M., Differential regulation of sphingomyelinase and ceramidase activities by growth factors and cytokines. Implications for cellular proliferation and differentiation. *J. Biol. Chem.*, 1995, *270,* 23305-23309.

Cuvillier O., Pirianov G., Kleuser B., Vanek P. J., Coso O. A., Gutkind J. S. & Spiegel S., Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature,* 1996, *381,* 800-803.

Cuvillier O., Rosenthal D. S., Smulson M. E. & Spiegel S., 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. *J. Biol. Chem.,* 1998, *273*, 2910-2916.

Del Canizo M. C., Brufau A., Almeida J., Galende M. A., Garcia-Marcos A., Mota A., Garcia R., Calvo F., Ramos F., Fisac P., Orfao A. & San Miguel J. F., *In vitro* growth in acute myeloblastic leukaemia : relationship with other clinico-biological characteristics of the disease. *Brit. J. Haematol.,* 1998, *103*, 137-142.

Devaux P., Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry,* 1991, *30*, 1163-1173.

Diaz-Laviada I., Larrodera P., Diaz-Meco M. T., Cornet M. E., Guddal P. H., Johansen T. & Moscat J., Evidence for a role of phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase C in the regulation of protein kinase C by ras and src oncogenes. *EMBO J.,* 1990, *9*, 3907-3912.

Haimovitz-Friedmann A., Kan C. C., Ehleiter D., Persaud R. S., McLoughlin M., Fuks Z. & Kolesnick R. N., Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J. Exp. Med.*, 1994, *180*, 525-535.

Hampton R. Y., Morand O. H., Sphingomyelin synthase and PKC activation. *Science,* 1989, *246,* 1050.

Hunter A. E., Rogers S. Y., Roberts I. A. G., Barret J. & Russel N., Autonomous growth of blast cells is associated with reduced survival in acute myeloblastic leukaemia. *Blood,* 1993, *82*, 899-903.

Jaffrézou J. P., Levade T., Bettaïeb A., Andrieu N., Bezombes C., Maestre N., Vermeersch S., Rousse A. & Laurent G., Daunorubicin induced apoptosis: triggering of ceramide generation through sphingomyelin hydrolysis. *EMBO J.,* 1996, *15*, 2417-2424.

Jaffrézou J. P., Bettaïeb A., Levade T. & Laurent G., Antitumor agent-induced apoptosis in myeloid leukemia cells: a controlled suicide. *Leuk. Lymphoma*, 1998a, *29*, 453-463.

Jaffrézou J. P., Maestre N., Mansat V., Bezombes C., Levade T. & Laurent G., Positive feedback control sphingomyelinase activity by ceramide. *FASEB J.,* 1998 *b*, *12*, 999-1006.

Kaplinski C., Lotem J. & Sachs L., Protection of human myeloid leukemic cells against doxorubicin-induced apoptosis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3. *Leukemia,* 1996, *10*, 460-465.

Kleuser B., Cuvillier O. & Spiegel S., 1α, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits programmed cell death in HL-60 cells by activation of sphingosine kinase. *Cancer Res.,* 1998, *58*, 1817-1824.

Kulik G., Klippel A. & Weber M. J., Antiapoptotic signaling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol. Cell. Biol.,* 1997, *17*, 1595-1606.

Kyriakis J. M. & Avruch J., Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J. Biol. Chem.,* 1996, *271,* 24313-24316.

Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Caceres-Cortes J., Minden M., Paterson B., Caligiuri M. A., Dick J. E., A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature,* 1994, *367*, 645-648.

Laredo J., Huynh A., Muller C., Jaffrézou J. P., Bailly J. D., Cassar G., Laurent G. & Demur C., Effect of the protein kinase C inhibitor staurosporine on the chemosensitivity to daunorubicin of normal and leukemic fresh myeloid cells. *Blood,* 1994, *84,* 229-237.

Lautier D., Bailly J. D., Demur C., Herbert J.M., Bousquet C. & Laurent G., Intracellular distribution of daunorubicin in acute myeloid leukemia cells. *Int. J. Cancer.,* 1997, *71*, 292-299.

Lavie Y., Cao H-t, Volner A., Lucci A., Han T.-Y., Geffen V., Giulano A. E. & Cabot M. C., Agents that reverse multidrug resistance, tamoxifen, verapamil, and cyclosporin A, block glycosphingolipid metabolism by inhibiting ceramide glycosylation in human cancer cells. *J. Biol. Chem.,* 1997, *272*, 1682-1687.

Levade T, Jaffrézou J. P., Andrieu N. & Laurent G., La voie sphingomyéline-céramide dans la réponse cellulaire aux agents anti-tumoraux. *Médecine et Sciences*, 1996, *12*, 1219-1227.

Linardic C. M. & Hannun Y. A., Identification of a distinct pool of sphingomyelin involved in the sphingomyelin cycle. *J. Biol. Chem.*, 1994, *269*, 23530-23537.

Liu Y. Y., Han T. Y., Giulano A. E., Cabot M. C., Expression of glucosylceramide synthase, converting ceramide to glucosylceramide, confers adriamycin resistance in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 1999, *274,* 1140-1146.

Lotem J. & Sachs L., Hematopoietic cytokines inhibit apoptosis induced by transforming growth factor β1 and cancer chemotherapy compounds in myeloid leukemic cells. *Blood,* 1992, *80*, 1750-1757.

Löwenberg B., van Putten W. L. J., Touw I. P., Delwel R. & Santini V., Autonomous proliferation of leukemic cells *in vitro* as a determinant of prognosis in adult acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.,* 1993, *328,* 614-619.

Mandala S. M., Thornton R., Tu Z., Kurtz M. B., Nickels J., Broach J., Menzeleev R. & Spiegel S., Sphingoid base 1-phosphate phosphatase: a key regulator of sphingolipid metabolism and stress response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1998, *95*, 150-155.

Mansat V., Laurent G., Bettaïeb A., Levade T., Jaffrézou J. P., The protein kinase C activators phorbol esters and phosphatidylserine inhibit neutral sphingomyelinase activation, ceramide generation and apoptosis triggered by daunorubicin. *Cancer Res.,* 1997 *a*, *57*, 5300-5304.

Mansat V., Bettaïeb A., Levade T., Laurent G. & Jaffrézou J. P., Serine-protease inhibitors block neutral sphingomyelinase activation, ceramide generation and apoptosis triggered by daunorubicin. *FASEB J.,* 1997 *b*, *11*, 695-702.

Mansat-De Mas V., Bezombes C., Quillet-Mary A., Bettaïeb A., de Thonel d'Orgeix A., Laurent G. & Jaffrézou J. P., Implication of radical oxygen species in ceramide generation, c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis induced by daunorubicin. *Mol. Pharmacol.,* sous presse.

Mazurek N., Megidish T., Hakomori S.-I. & Igarashi Y., Regulatory effect of phorbol esters on sphingosine kinase in BALB/C 3T3 fibroblasts (variant A31): demonstration of cell type-specific response. Biochem. Biophys. *Res. Commun.,* 1994, 198, 1-9.

Moscat J. & Diaz-Meco M. T., ζ protein kinase C: a new target for antiproliferative interactions. *Anti-Cancer Drugs,* 1997, *7*, 143-148.

Nakanishi H. & Breuer K. A. & Exton J. H., Activation of the z isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate. *J. Biol. Chem.,* 1993, *268,* 13-16.

Obeid L. M., Linardic .M., Karolak L. A. & Hannun Y. A., Programmed cell death induced by ceramide. *Science,* 1993, *259*, 1769-1772.

Perez G. I., Knudson C. M., Leykin L., Korsmeyer S. J., Tilly J. L., Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. *Nat. Med.*, 1997, *3*, 1228-1232.

Plo I., Bettaïeb A., Payrastre B., Mansat-De Mas V., Bordier C., Rousse A., Kowalski-Chauvel A., Laurent G. & Lautier D., Phosphoinositide 3-kinase/Akt-mediated survival pathway is activated by daunorubicin in human acute myeloid leukemia cell lines. *FEBS lett.*, 1999, *452*, 150-154.

Price B. D. & Youmell M. B., The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin sensitizes murine fibroblasts and human tumor cells to radiation and blocks induction of p53 following DNA damage. *Cancer Res.*, 1996, *56*, 246-250.

Quillet-Mary A., Jaffrézou J. P., Mansat V., Bordier C., Laurent G., Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 1997, *272*, 21388-21395.

Rakhit S., Conway A. M., Tate R., Bower T., Pyne N. J. & Pyne S., Sphingosine 1-phosphate stimulation of the p42/p44 mitogen-activated protein kinase pathway in airway smooth muscle. Role of endothelial differentiation gene 1, c-src tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J.*, 1999, *338*, 643-649.

Rani C. S., Abe A., Chang Y., Rosenzweig N., Saltiel A. R., Radin N. S. & Shayman J. A., Cell cycle arrest induced by an inhibitor of glucosylceramide synthase. Correlation with cyclin-dependent kinases. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 2859-2867.

Rao P. & Mufson R. A., Human interleukin-3 stimulates a phosphatidylcholine specific phospholipase C and protein kinase C translocation. *Cancer Res.*, 1994, *54*, 777-781.

Rao P., Kitamura T., Miyajima A., Mufson R. A., Human IL-3 receptor signaling : rapid induction of phosphatidylcholine hydrolysis is independent of protein kinase C but dependent on tyrosine phosphorylation in transfected NIH 3T3 cells. *J. Immunol.*, 1995, *154*, 1664-1674.

Rodriguez-Viciana P., Warne P. H., Khwaja A., Marte B. M., Pappin D., Das P., Waterfield M. D., Ridley A. & Downward J., Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell*, 1997, *89*, 457-467.

Rottapel R., Turck C., Casteran N., Liu X., Birnbaum D., Pawson T. & Dubreuil P., Substrate specificities and identification of a putative binding site for PI3K in the carboxy tail of the murine Flt3 receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, 1994, *9*, 1755-1765.

Sato N., Sakamaki K., Terada N., Arai K.-I. & Miyajima A., Signal transduction by the high-affinity GM-CSF receptor: two distinct cytoplasmic regions of the common β subunit responsible for different signaling. *EMBO J.*, 1993, *12*, 4181-4189.

Sattler M., Salgia R, Shrikhande G., Verma S., Pisick E., Prasad K. V. S. & Griffin J. D., Steel factor induces tyrosine phosphorylation of CRKL and binding of CRKL to a complex containg c-Kit, phosphatidylinositol 3-kinase, and p120 CBL. *J. Biol. Chem.*, 1997, *272*, 10248-10253.

Ségui B., Bezombes C., Uro-Costes E., Medin J. A., Andrieu-Abadie N., Augé N., Brouchet A., Salvayre R., Laurent G., Jaffrézou J. P. & Levade T., Stressed induced apoptosis is not mediated by lysosomal ceramide. *FASEB J.*, sous presse.

Shayman J. A., Deshmukh G. D., Mahdiyoun S., Thomas T. P., Wu D., Barcelon F. S. & Radin N. S., Modulation of renal epithelial cell growth by glucosylceramide. Association with protein kinase C, sphingosine, and diacylglycerol. *J. Biol. Chem.*, 1991, *266*, 22968-22974.

Skorski T., Bellacosa A., Nieborovska-Skorska M., Majewski M., Martinez R., Choi J. K., Trotta R., Wlodarski P., Perrotti D., Chan T. O., Wasik M. A., Tsichlis P. N. & Calabretta B., Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3K/Akt-dependent pathway. *EMBO J.*, 1997, *16*, 6151-6161.

Sutherland H. J., Blair A. & Zapf R. W., Characterization of a hierarchy in human myeloid leukemia progenitor cells. *Blood*, 1996, *87*, 4754-4761.

Toker A., Meyer M., Reddy K. K., Falck J. R., Aneja R., Aneja S., Parra A., Burns D. J., Ballas L. M. & Cantley L. C., Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3. *J. Biol. Chem.*, 1994, *269*, 32358-32367.

Uli M., Okada T., Hazeki K. & Haseki O., Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, phosphoinositide 3-kinase. *TIBS*, 1995, *20*, 303-305.

Van Dijk M. C. M., Hilkmann H. & van Blitterswijk W. J., Platelet-derived growth factor activation of mitogen-activated protein kinase depends on the sequential activation of phosphatidylcholine-specific phospholipase C, protein kinase C-ζ and Raf-1. *Biochem. J.*, 1997, *325*, 303-307.

Verheij M., Bose R., Lin X. H., Yao B., Jarvis W. D., Grant S., Birrer M. J., Szabo E., Zon L. I., Kyriakis J. M., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z. & Kolesnick R. N., Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature*, 1996, 380, 75-79.

Xu J., Chen-Hsiung Y., Chen S., He L., Sensi S. L., Canzoniero L. M. T., Choi D. W. & Hsu C. Y., Involvement of *de novo* ceramide biosynthesis in tumor necrosis factor-α/cycloheximide-induced cerebral endothelial cell death. *J. Biol. Chem.*, 1998, *273*, 16521-16526.