

## Voies de signalisation de l'apoptose médiées par les sphingolipides

par Olivier Cuvillier, Nathalie Andrieu-Abadie, Bruno Ségui, Sophie Malagarie-Cazenave, Claudine Tardy, Elisabeth Bonhoure et Thierry Levade

Laboratoire de Biochimie IV « Maladies Métaboliques » et INSERM Unité 466, Institut Louis Bugnard, CHU Rangueil, 31059 Toulouse cedex 9, France. Mel : levade.t@chu-toulouse.fr

Reçu le 15 janvier 2003

### RÉSUMÉ

Divers sphingolipides sont aujourd'hui reconnus comme étant doués de propriétés biologiques et/ou agissant comme seconds messagers. Parmi eux, le céramide (ou N-acylsphingosine) et la sphingosine se comportent comme des médiateurs généralement pro-apoptotiques. Ainsi, le céramide relaie le signal cytotoxique d'un certain nombre d'agents de stress qui, soit, stimulent sa biosynthèse *de novo*, soit, activent l'hydrolyse de sphingomyéline par des sphingomyélinases. Par exemple, la génération précoce de céramide induite par le TNF est médiée par une sphingomyélinase neutre dont l'activité est sous la dépendance de la protéine adaptatrice FAN, contrôlant ainsi l'activation

des caspases et le processus apoptotique. De plus, l'activité de cette sphingomyélinase neutre semble être modulée négativement par la cavéoline, un constituant essentiel de certains microdomaines membranaires. Par ailleurs, la sphingosine kinase est une enzyme-clé du métabolisme des sphingolipides car elle contrôle les taux intracellulaires de deux molécules aux effets antagonistes, la sphingosine, pro-apoptotique, et la sphingosine 1-phosphate, anti-apoptotique. Le métabolisme du céramide et de la sphingosine est donc considéré actuellement comme au cœur d'un ensemble de voies de signalisation régulant le devenir de la cellule.

### SUMMARY Sphingolipid-mediated apoptotic signalling pathways

Various sphingolipids are being viewed as bioactive molecules and/or second messengers. Among them, ceramide (or N-acylsphingosine) and sphingosine generally behave as pro-apoptotic mediators. Indeed, ceramide mediates the death signal initiated by numerous stress agents which either stimulate its *de novo* synthesis or activate sphingomyelinases that release ceramide from sphingomyelin. For instance, the early generation of ceramide promoted by TNF is mediated by a neutral sphingomyelinase the activity of which is regulated by the FAN adaptor protein, thereby controlling caspase activation and the cell

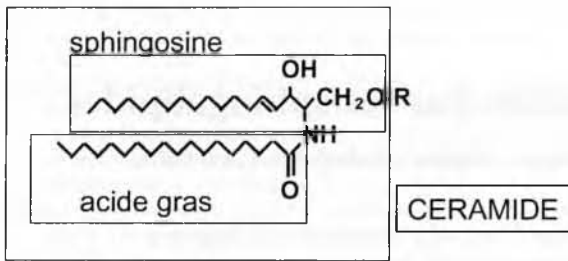
death programme. In addition, the activity of this neutral sphingomyelinase is negatively modulated by caveolin, a major constituent of some membrane microdomains. The enzyme sphingosine kinase also plays a crucial role in apoptosis signalling by regulating the intracellular levels of two sphingolipids having opposite effects, namely the pro-apoptotic sphingosine and the anti-apoptotic sphingosine 1-phosphate molecule. Ceramide and sphingosine metabolism therefore appears as a pivotal regulatory pathway in the determination of cell fate.

De nouvelles voies de signalisation médiées par des molécules lipidiques ont été récemment identifiées dans les cellules eucaryotes. Elles font intervenir certains sphingolipides, et notamment le céramide, la sphingosine et la sphingosine 1-phosphate.

### STRUCTURE GÉNÉRALE DES SPHINGOLIPIDES

Les sphingolipides sont des lipides complexes, présents dans toutes les cellules eucaryotes et plus parti-

culièrement au niveau des membranes plasmiques. Ces molécules contiennent toutes une base à chaîne longue, la sphingosine, qui peut être acylée pour donner naissance au céramide puis aux autres sphingolipides (Figs. 1 et 2). Tandis que la majorité des étapes de biosynthèse ont lieu dans le reticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, le catabolisme se produit essentiellement, mais pas exclusivement, dans les compartiments acides. La sphingosine peut aussi être phosphorylée en sphingosine 1-phosphate grâce à la sphingosine kinase.



Substituant (R)	Sphingolipide
H	céramide
phosphocholine	sphingomyéline
sucre(s)	glycosphingolipide

FIG. 1. – Structure des sphingolipides.

Parmi les molécules sphingolipidiques douées de propriétés biorégulatrices, céramide et sphingosine sont plutôt reconnues comme modulant de façon positive les processus d'apoptose, alors que la sphingosine 1-phosphate se comporte généralement comme médiateur anti-apop-

totique (Fig. 2). Le céramide impliqué dans ces phénomènes de signalisation provient soit d'un accroissement de sa synthèse *de novo* (à partir de sérine et de palmitoyl-CoA), soit d'une dégradation de la sphingomyéline (SM), un sphingophospholipide ubiquitaire, *via* la stimulation d'une activité sphingomyélinasique. Cette génération de céramide bioactif semble être activée par de nombreux agonistes et médierait des réponses biologiques variées, dont l'induction de la mort cellulaire par apoptose (Kolesnick & Krönke, 1998 ; Hannun & Luberto, 2000 ; Levade *et al.*, 2002).

## RÔLE DE LA SPHINGOMYÉLINASE ACIDE DANS L'APOPTOSE

Comme l'activation d'une sphingomyélinase (SMase) acide, présente dans les compartiments cellulaires acides, a été décrite comme responsable de la mort induite par des agents de stress, un phénomène néanmoins très débattu (Levade & Jaffrézou, 1999), nous avons recherché si les céramides formés ou accumulés dans les lysosomes sont réellement responsables du processus d'apoptose.

Nous avons pu montrer que la stimulation de fibroblastes humains transformés par le TNF (facteur de

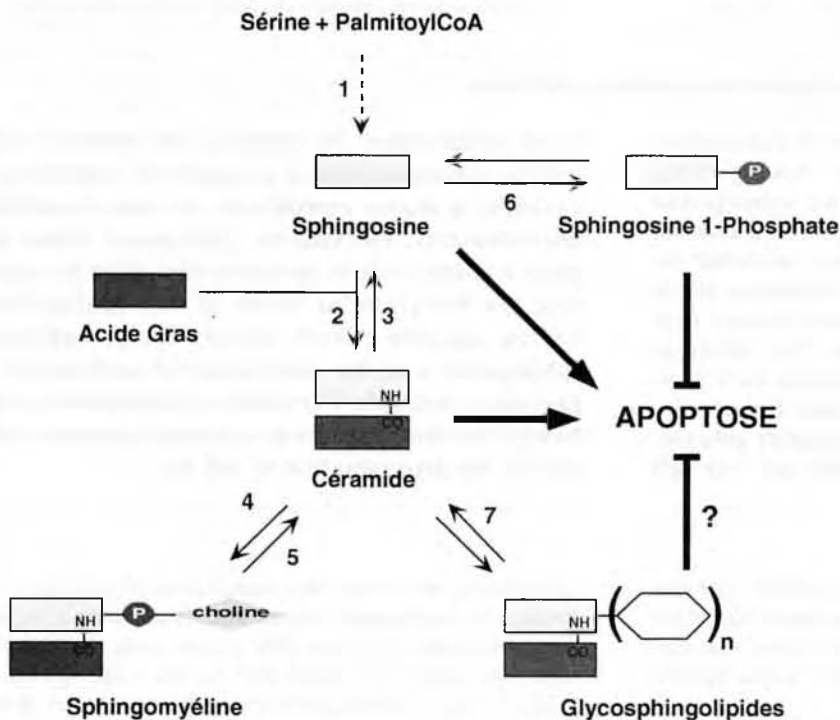


FIG. 2. – Principales voies métaboliques des sphingolipides impliqués dans l'apoptose.

- 1 - sérine palmitoyl transférase
- 2 - céramide synthase
- 3 - céramidase
- 4 - sphingomyéline synthase
- 5 - sphingomyélinase
- 6 - sphingosine Kinase
- 7 - glycosidase (s)

nécrose tumorale) ou le ligand du CD40, *via* les récepteurs de la superfamille du TNFR, conduit à une mort par apoptose observable aussi bien dans des cellules témoins que dans des cellules de patients atteints par la maladie de Farber, une pathologie héréditaire due au déficit de l'activité de la céramidase acide et qui se caractérise par une accumulation lysosomale de céramide (Ségui *et al.*, 2000).

L'induction d'apoptose par un anti-CD95, le TNF, la daunorubicine ou les radiations ionisantes est également comparable dans des cellules lymphoblastoïdes témoins et des cellules de patients atteints de la maladie de Farber. Des résultats semblables ont été observés dans des cellules lymphoïdes déficitaires en SMase acide (c'est-à-dire des cellules issues de patients atteints de la maladie de Niemann-Pick) (Bezombes *et al.*, 2001).

La correction métabolique complète de ces lignées, par transfert de l'ADNc de la céramidase acide à l'aide d'un vecteur rétroviral dans des fibroblastes de Farber, ou de la SMase acide dans des cellules de Niemann-Pick, n'affecte pas la réponse apoptotique des cellules.

Ces résultats suggèrent que le céramide impliqué dans l'apoptose induite par les agents de stress n'est pas endo-lysosomal (Ségui *et al.*, 2000; Bezombes *et al.*, 2001), et indiquent plutôt l'activation d'une SMase neutre (ou nSMase).

## RÔLE DES CAVÉOLES DANS LA SIGNALISATION SPHINGOLIPIDIQUE

Ayant préalablement démontré que l'hydrolyse de SM activée par le TNF semble se produire au niveau de la membrane plasmique, préférentiellement dans son feuillet interne (Andrieu *et al.*, 1996), nous avons analysé le rôle des microdomaines dans cette voie de signalisation.

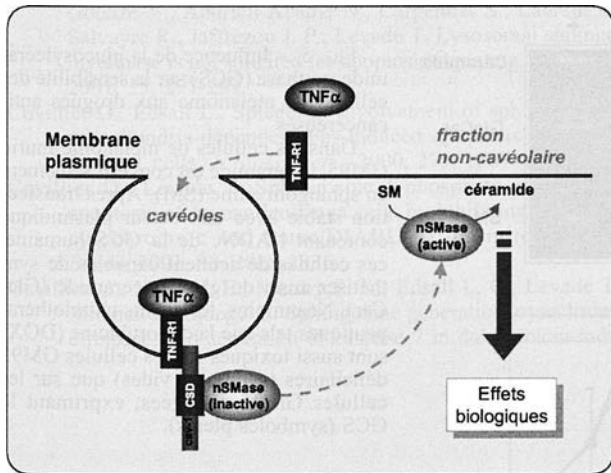


FIG. 3. – Modèle d'action du TNF dans la génération de céramide.

Nous avons montré la présence de SMase neutre dans les cavéoles (microdomaines enrichis en cavéoline) de fibroblastes humains. Cette forme de SMase est régulée par la cavéoline puisque son activité est inhibée, comme de nombreuses autres protéines de la signalisation, par un peptide correspondant au CSD ou « *caveolin-scaffolding domain* » (Veldman *et al.*, 2001). Sous l'effet d'une stimulation des cellules par le TNF, le récepteur-1 de cette cytokine se relocalise dans les microdomaines et stimule la production de céramide par hydrolyse de SM. Comme cette génération de céramide aux dépens de la SM a lieu dans les régions de la membrane dépourvues en cavéoline, il est vraisemblable que la liaison du TNF à son récepteur permet l'activation de la SMase neutre en la libérant de son ancrage à la cavéoline (Fig. 3). Des observations similaires sur cellules leucémiques soulignent le rôle des microdomaines dans l'induction de l'apoptose médiée par les sphingolipides sous l'effet des anticancéreux (Grazide *et al.*, 2002).

## RÔLE DE LA SPHINGOMYÉLINASE NEUTRE ET DE LA PROTÉINE FAN DANS LA SIGNALISATION APOPTOTIQUE

Étant donné que l'activation par le TNF de la SMase neutre est médiée par la protéine adaptatrice FAN (« *Factor Associated with Neutral SMase activation* ») (Adam-Klages *et al.*, 1996), nous avons analysé le rôle de FAN dans la signalisation apoptotique du récepteur-1 (ou p55) au TNF et du récepteur CD40.

L'expression stable d'une forme dominante-négative de FAN dans des fibroblastes humains transformés entraîne la disparition de la réponse au TNF et au CD40 en termes de production de céramide à partir de l'hydrolyse de SM ainsi qu'une résistance partielle à l'apoptose induite par le TNF ou le CD40 ligand. Les fibroblastes de souris « knock-out » pour FAN présentent également une résistance partielle à la mort médiée par le TNF et le CD40 (Ségui *et al.*, 1999; Ségui *et al.*, 2001).

Ces résultats soulignent le rôle jusque-là méconnu de la protéine FAN dans la signalisation de la mort cellulaire par apoptose induite par les récepteurs TNFR1 (Fig. 4) et CD40.

## RÔLE DU GLUCOSYLCÉRAMIDE DANS LA SIGNALISATION APOPTOTIQUE

Il a été proposé que la conversion du céramide en glucosylcéramide (GlcCer), le premier des glycosphingolipides, par l'action de la glucosylcéramide synthase (GCS) pouvait constituer un moyen d'échapper à la mort cellulaire et rendre ainsi compte du phénomène de résistance pléiotropique (phénotype MDR) bien connu des cancérologues. Il a été ainsi suggéré que l'élévation du contenu cellulaire en GlcCer pouvait servir de marqueur d'un phénotype multirésistant, et que l'activité de la GCS pouvait exercer un rôle-clé dans la sensibilité des cellules

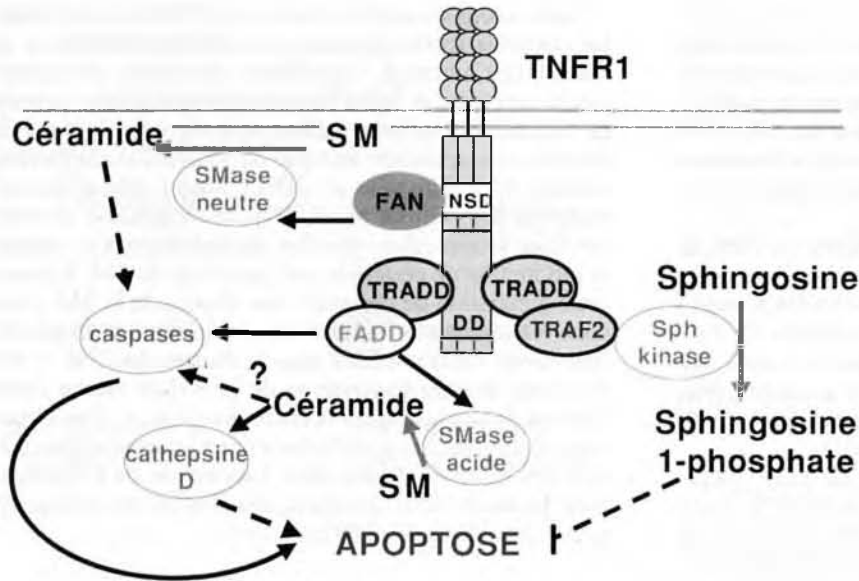


FIG. 4. – Rôle des protéines adaptatrices du récepteur-1 au TNF (TNFR1) dans la production de céramide par des sphingomyélinases (SMases) ou de sphingosine 1-phosphate par la sphingosine kinase, et le contrôle de l'apoptose.

Abréviations : DD, death domain ; FADD, Fas-Associated Death Domain protein ; FAN, Factor Associated with Neutral sphingomyelinase activation ; NSD, Neutral Sphingomyelinase activation Domain ; TRADD, TNF Receptor-Associated Death Domain protein ; TRAF, TNF Receptor-Associated Factor.

tumorales aux agents antinéoplasiques (Liu *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 2001).

Nous avons réévalué ce rôle en utilisant un modèle de mélanome murin totalement déficitaire en GCS. Nous montrons que ces cellules, quoique incapables de synthétiser du glucosylcéramide à partir du céramide, demeurent tout aussi sensibles à diverses drogues anticancéreuses (telles que les anthracyclines) que leurs homologues génétiquement corrigées exprimant une GCS fonctionnelle (Fig. 5). Ces résultats indiquent donc que le phénotype MDR n'est pas corrélé directement et systématiquement à l'activité de la GCS.

### RÔLE DE LA SPHINGOSINE ET DE LA SPHINGOSINE 1-PHOSPHATE DANS LA SIGNALISATION APOPTOTIQUE

Nos travaux ont établi que la sphingosine (métabolite issu de la dégradation du céramide par l'action d'une céramidase) pourrait relayer le signal apoptotique médié par le céramide, en particulier lors de l'apoptose induite par les cytokines, l'irradiation et un anticancéreux, la doxorubicine (Cuvillier *et al.*, 2000 ; Cuvillier *et al.*, 2001 ; Nava *et al.*, 2001). La sphingosine 1-phosphate

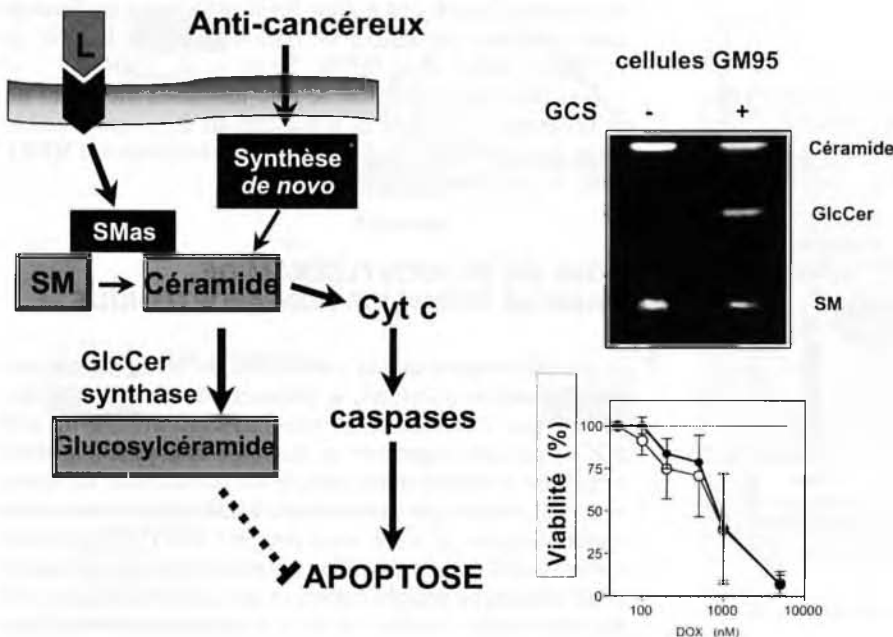


FIG. 5. – Influence de la glucosylcéramide synthase (GCS) sur la sensibilité des cellules de mélanome aux drogues anticancéreuses.

Dans les cellules de mélanome murin GM95, le céramide est converti seulement en sphingomyéline (SM). Après transfection stable avec un vecteur plasmidique contenant l'ADNc de la GCS humaine, ces cellules deviennent capables de synthétiser aussi du glucosylcéramide (GlcCer). Néanmoins, les agents chimiothérapeutiques tels que la doxorubicine (DOX) sont aussi toxiques sur les cellules GM95 déficientes (symboles vides) que sur les cellules GM95 corrigées, exprimant la GCS (symboles pleins).

(produit de la phosphorylation de la sphingosine par la sphingosine kinase), quant à elle, inhibe l'apoptose en bloquant la machinerie d'autodestruction induite par le céramide (Cuvillier *et al.*, 1996; Cuvillier *et al.*, 1998; Cuvillier & Levade, 2001). Ainsi, nous avons proposé que la régulation du rhéostat céramide/sphingosine 1-phosphate, et ses conséquences, est déterminante pour le destin de la cellule (Cuvillier *et al.*, 1996). Bien que ce rhéostat puisse être inhérent à chaque type cellulaire, un stimulus externe pourra réguler l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme de ces sphingolipides déterminant ainsi si un signal doit être relayé par le céramide (et/ou la sphingosine ?) ou la sphingosine 1-phosphate, et de l'équilibre entre ces métabolites dépendra la survie ou la mort de la cellule.

L'ensemble de ces observations souligne la place considérable des sphingolipides dans les cascades transductionnelles de l'apoptose (Kolesnick & Krönke, 1998; Hannun & Luberto, 2000; Andrieu-Abadie *et al.*, 2001; Levade *et al.*, 2002) mais aussi d'autres effets biologiques (Levade *et al.*, 2001). Une meilleure connaissance des fonctions biorégulatrices des sphingolipides devrait conduire au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur la modulation des taux de ces molécules bioactives impliquées dans le contrôle de la croissance et/ou de la mort cellulaire.

## BIBLIOGRAPHIE

- Adam-Klages S., Adam D., Wiegmann K., Struve S., Kolanus W., Schneider-Mergener J., Kronke M. FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell*, 1996, 86, 937-947.
- 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.
- Andrieu-Abadie N., Gouazé V., Salvayre R., Levade T. Ceramide in apoptosis signaling : relationship with oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.*, 2001, 31 : 717-728.
- Bezombes C., Ségui B., Cuvillier O., Bruno A. P., Uro-Coste E., Gouazé V., Andrieu-Abadie N., Carpentier S., Laurent G., Salvayre R., Jaffrèzou J. P., Levade T. Lysosomal sphingomyelinase is not solicited for apoptosis signaling. *FASEB J.*, 2001, 15, 297-299.
- Cuvillier O., Edsall L., Spiegel S. Involvement of sphingosine in mitochondria-dependent Fas-induced apoptosis of type II Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 15691-15700.
- Cuvillier O., Levade T. Sphingosine 1-phosphate antagonizes apoptosis of human leukemia cells by inhibiting release of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria. *Blood*, 2001, 98, 2828-2836.
- Cuvillier O., Nava V. E., Murthy S. K., Edsall L. C., Levade T., Milstien S., Spiegel S. Sphingosine generation, cytochrome c release, and activation of caspase-7 in doxorubicin-induced apoptosis of MCF7 breast adenocarcinoma cells. *Cell Death Differ.*, 2001, 8, 162-171.
- Cuvillier O., Pirianov G., Kleuser B., Vanek P. G., Coso O. A., Gutkind J. S., Spiegel S. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine 1-phosphate. *Nature*, 1996, 361, 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.
- Grazide S., Maestre N., Veldman R. J., Bezombes C., Maddens S., Levade T., Laurent G., Jaffrèzou J. P. Ara-C- and daunorubicin-induced recruitment of Lyn in sphingomyelinase-enriched membrane rafts. *FASEB J.*, 2002, 16, 1685-1687.
- Hannun Y. A., Luberto C. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol.*, 2000, 10, 73-80.
- Kolesnick R. N., Krönke M. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Ann. Rev. Physiol.*, 1998, 60, 643-665.
- Levade T., Augé N., Veldman R. J., Cuvillier O., Nègre-Salvayre A., Salvayre R. Sphingolipid mediators in cardiovascular cell biology and pathology. *Circ. Res.*, 2001, 89, 957-968.
- Levade T., Jaffrèzou J.P. Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, 1438, 1-17.
- Levade T., Malagarie-Cazenave S., Gouazé V., Ségui B., Tardy C., Betito S., Andrieu-Abadie N., Cuvillier O. Ceramide in apoptosis: a revisited role. *Neurochem. Res.*, 2002, 27, 601-607.
- Liu Y. Y., Han T. Y., Giuliano A. E., Cabot M. C. Expression of glucosyl-ceramide synthase, converting ceramide to glucosylceramide, confers adriamycin resistance in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 1140-1146.
- Liu Y. Y., Han T. Y., Giuliano A. E., Cabot M. C. Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *FASEB J.*, 2001, 15, 719-730.
- Nava V., Cuvillier O., Edsall L., Kimura K., Murthy S., Gellmann E. P., Spiegel S. Sphingosine enhances apoptosis of radiation resistant prostate cancer cells. *Cancer Res.*, 2000, 60, 4468-4474.
- Ségui B., Andrieu-Abadie N., Adam-Klages S., Meilhac O., Kredder D., Garcia V., Bruno A. P., Jaffrèzou J. P., Salvayre R., Kronke M., Levade T. CD40 signals apoptosis through FAN-regulated activation of the sphingomyelin-ceramide pathway. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 37251-37258.
- Ségui B., Bezombes C., Uro-Coste E., Medin J. A., Andrieu-Abadie N., Augé N., Brouchet A., Laurent G., Salvayre R., Jaffrèzou J. P., Levade T. Stress-induced apoptosis is not mediated by endolysosomal ceramide. *FASEB J.*, 2000, 14, 36-47.
- Ségui B., Cuvillier O., Adam-Klages S., Garcia V., Malagarie-Cazenave S., Lévêque S., Caspar-Bauguil S., Coudert J., Salvayre R., Kronke M., Levade T. Involvement of FAN in TNF-induced apoptosis. *J. Clin. Invest.*, 2001, 108, 143-151.
- Veldman R. J., Maestre N., Aduib O. M., Medin J. A., Salvayre R., Levade T. A neutral sphingomyelinase resides in sphingolipid-enriched microdomains and is inhibited by the caveolin-scaffolding domain: potential implications in tumour necrosis factor signalling. *Biochem J.*, 2001, 355, 859-868.

