

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2011

THESE N°

**METABOLISME DE LA SPHINGOSINE 1-PHOSPHATE DANS
LE MELANOME CUTANE : EFFETS SUR LA MIGRATION ET
LA CHIMIORESISTANCE**

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Obtenu après soutenance du

**MEMOIRE
Du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale**

Présenté et soutenu publiquement

Le 21 Octobre 2011 à Toulouse

Par

Marie-Lise BATS

née à Mont-de-Marsan le 11 février 1983

EXAMINATEURS DE LA THESE

M. le Professeur Jean-Louis BENEYTOU Président
M. le Professeur Hervé BENOIST Juge
M. le Professeur Daniel CUSSAC Juge
M. le Professeur Thierry LEVADE..... Juge
Mme le Docteur Nathalie ANDRIEU-ABADIE..... Membre invité

REMERCIEMENTS

A M. le Professeur Jean-Louis Beneytout,

Je vous remercie pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse et pour avoir accepté de juger ce travail. Vous avez accepté de vous déplacer jusqu'à Toulouse et je vous en suis extrêmement reconnaissante.

A M. le Professeur Daniel Cussac et M. le Professeur Hervé Benoist,

Je vous remercie pour avoir accepté de participer à ce jury et pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Recevez ici toute ma gratitude.

A M. le Professeur Thierry Levade,

Je vous remercie pour m'avoir accueillie au sein de votre équipe de recherche et pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Merci également pour votre disponibilité, vos conseils avisés et pour l'immense savoir scientifique que vous savez particulièrement bien partager. Soyez assuré de mon plus profond respect.

A Mme le Docteur Nathalie Andrieu-Abadie,

Je te remercie pour avoir accepté de corriger ce travail. Merci pour la qualité de ton encadrement scientifique, pour ta gentillesse, ta patience et ton implication journalière dans l'avancée de ma « vraie » thèse ! Sois assurée de toute ma gratitude.

Je tiens à remercier sincèrement tous les membres de l'équipe 4 du CRCT pour avoir su m'intégrer dans le monde de la recherche. Merci pour tous les bons moments passés ensemble, pour votre savoir scientifique et technique. Je pense également à Guillaume et Léo, les étudiants masculins de l'équipe (il y en a tellement peu que c'est à souligner), merci pour vos conseils en tous genres! Et une pensée toute particulière pour mes chères voisines de bureau : Sandra, Anne, Julie, Julia, Claire, Elodie et puis Virginie, mon inséparable binôme. Les filles, sachez que votre bonne humeur au quotidien et votre écoute m'ont particulièrement aidée ces derniers temps, je vous en suis très reconnaissante.

Je remercie également le Professeur Chap pour m'avoir permis d'effectuer ma spécialisation en Biochimie. Merci à tous les membres du laboratoire de biochimie de Purpan pour leur accueil, leur formation et leur professionnalisme. Je n'oublie pas Marie, Christophe, Arnaud, Vincent, Laura, Céline et Ikram, mes chers co-internes de bioch', avec qui j'ai passé de très agréables semestres tant sur le plan humain que professionnel.

Merci à l'ensemble des co-internes que j'ai rencontrés tout au long de mon internat, des amitiés sont parfois nées de ces rencontres. Isa, Julie, Romain, Pierre je pense à vous en particulier. Je garde d'excellents souvenirs de ces cinq dernières années, que ce soit en stage, en garde et tout particulièrement en soirées! A propos de soirées, les filles n'oubliez pas l'ancienne dorénavant!!!

Un grand merci aussi au personnel des CHU de Limoges, Bordeaux et Toulouse. Grâce à l'internat, la géographie, la culture et la gastronomie du Sud-Ouest n'ont plus de secret pour moi !

De façon plus personnelle, je tiens également à adresser mes remerciements à mes proches :

Tous les copains des Landes qui n'ont, pour la plupart, toujours pas compris ce que je faisais dans la vie !!!

*Les coéquipières de longue date et copines de toujours : binôme Chacha, coach Aurélie, Jo, Chichi, Bègue, Laure, Anna, Vivi, Flo, Mimy, Sandrine, Sylvia, Karine, Aurélie et Marina.
Un grand merci pour votre compréhension face à des années d'absence aux entraînements !!!*

*Les anciens pharma de Bordeaux : Paulo, Elsa, Juju et surtout mon Rominou et ma Nathou.
Merci à vous deux pour m'avoir supportée (dans tous les sens du terme), pour m'avoir accordé votre confiance avec Loulou et pour avoir déménagé dans les Landes !!!*

*Enfin Papa, Maman, Pauline, Damien, ma petite Luce et toute la famille,
Je souhaite vous remercier du fond du cœur pour tout le soutien que vous m'apportez depuis 10 années déjà, la dernière ayant été un peu plus difficile que les autres. Simplement merci d'avoir été là, en toutes circonstances.*

LISTE DU CORPS ENSEIGNANT DE LA FACULTE

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**
1^{er} VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences
2^{ème} VICE-DOYEN : Monsieur Serge **BATTU**, Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DREYFUSS Gilles	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET
	INFORMATIQUE
OUDART Nicole	PHARMACOLOGIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
ROGEZ Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET
	INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSEE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE

LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
ROUSSEAU Annick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
SIMON Alain	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

DREYFUSS Marie-Françoise CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

PROFESSEUR CERTIFIE :

MARBOUTY Jean-Michel ANGLAIS

RESUME

Le mélanome cutané qui se développe à partir des mélanocytes de l'épiderme détient le triste record du cancer ayant la plus forte progression depuis 20 ans. Le pronostic est sombre en cas de lésions disséminées ou inopérables car les traitements systémiques actuels sont inefficaces. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques s'avère indispensable afin de lutter contre ce cancer redoutable.

Dans la famille des sphingolipides, la Sphingosine 1-phosphate (S1P) est un lipide bioactif dit « promoteur de tumeur » qui inhibe l'apoptose et stimule la prolifération cellulaire. Synthétisée par une sphingosine kinase et dégradée par une sphingosine 1-phosphate lyase, la S1P possède un métabolisme très fortement corrélé à l'activation des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) et d'AKT, qui sont aussi les voies de signalisation les plus fréquemment altérées dans la physiopathologie du mélanome cutané. L'activation de ces voies par des oncogènes (*NRAS*, *BRAF*) ou par la perte de suppresseurs de tumeur (*PTEN*) semble intervenir dans la progression, la dissémination et la chimiorésistance du mélanome.

Par différentes approches effectuées sur des lignées de mélanome provenant de stades invasifs et métastatiques, nous avons pu observer que l'expression des enzymes qui contrôlent la production de S1P était très fortement modifiée dans les cellules tumorales comparée aux mélanocytes sains ainsi qu'*in situ* dans des tumeurs cutanées mélaniques humaines. Ces modifications sont en faveur de l'accumulation de ce lysophospholipide dans les cellules néoplasiques. Par la suite, nous avons mis en évidence que la S1P sécrétée agissait de façon autocrine via les S1PRs et favorisait la migration des cellules de mélanome. De plus, nous avons remarqué que l'inhibition transitoire de la production de S1P diminuait la résistance des cellules tumorales au traitement par la Dacarbazine alors que l'augmentation des taux intracellulaires de S1P favoriserait la résistance des cellules à la chimiothérapie. Enfin, l'étude des interactions moléculaires dans la cellule de mélanome semble indiquer que l'expression de SK1 est modulée par l'oncogène BRaf à travers la phosphorylation des MAPKs.

Finalement, ce travail constitue un premier pas vers la compréhension du rôle de la S1P dans la signalisation cellulaire, la migration et la chimiorésistance du mélanome cutané. Ces résultats préliminaires pourraient permettre à long terme le développement de stratégies thérapeutiques ciblant le métabolisme de la S1P.

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC-transporter : transporteur ATP-binding Cassette
AC : Adénylate cyclase
AKT : cf PKB
ALMM : Acral lentiginous Malignant Melanoma
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
ATP : Adénosine Tri-phosphate
 α -MSH : alpha Melanocyte Stimulating Hormone
Bad : Bcl-2-associated death promoter
Bax : Bcl-2 associated X protein
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
Bcl-xl : B-cell lymphoma extra-large
bHLH-LZ : basic helix-loop-helix leucine zipper
BRaf : V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BSA : Bovine Serum Albumin
C1PP : Céramide 1-phosphate phosphatase
CDase : Céramidase
CDK4 : Cyclin-Dependent Kinase 4
CDKN2A : Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A
CK : Céramide kinase
cKIT : Tyrosine-protein kinase Kit
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CREB : cAMP-Responsive Element Binding
CRS : Cérébrosidase
CS : Céramide synthase
CTLA4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DAG : Diacyl Glycérol
DES : Dihydrocéramide désaturase
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMS : N,N Diméthyl Sphingosine
DMSO : Diméthyl-sulfoxyde
EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique
EDG : Endothelial Differentiation Gene
EGF : Epithelial Growth Factor
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
FGF : Fibroblast Growth Factor
FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor
GALC : galactosylcéramidase
GALT : galactosyltransférase
GCS : glucosylcéramide synthase
GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

GRB2 : Growth factor receptor-bound protein 2
HDAC : Histone Deacetylase
HEK : Human Embryonic Kidney
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HIF : Hypoxia Inducible Factor
Ig : Immunoglobulines
IGF : Insulin-like Growth Factor
IL-1 : Interleukine 1
kDa : kilo Dalton
KO : Knock-Out
LPA : Acide Lysophosphatidique
LPS : Lipopolysaccharide
LMM : Lentigo Malignant Melanoma
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
Mcl-1 : Myeloid cell leukemia sequence 1
MC1R : MelanoCortin 1 Receptor
MDM2 : Murine Double Minute 2 oncogene
MDR : MultiDrug Resistance
MEK : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MET : MNNG HOS Transforming gene , récepteur tyrosine kinase au HGF
MITF : Microphthalmia-associated Transcription Factor
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
MTT : bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium
NFκB : Nuclear Factor Kappa B
NGF : Nerve Growth Factor
NK : Natural Killer
NMM : Nodular Malignant Melanoma
NOS : Nitric Oxyde Synthase
PBS : Phosphate Buffered Saline
PC : Phosphatidylcholine
PCR : Polymerase chain Reaction
PDK1 : 3-phosphoinositide Dependant Protein K1
PDGF : Platelet Derived Growth Factor
PIP3 : Phosphatidyl-Inositol Tri Phosphate
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PKB : Phosphokinase B ou AKT
PLC : Phospholipase C
PLD : Phospholipase D
PMA : Phorbol 12-myristate 13-acétate
PMSF : Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride
PP2A : Protein Phosphatase 2A
PS : Phosphatidylserine
PTEN : Phosphatase and Tensin Homolog
PTX : Toxine Pertussique

RA-GEF : Rap1A Guanine Nucleotide Exchange Factor
RAS : Rat Sarcoma
Rb : Rétinoblastome
RE : Réticulum endoplasmique
RGP : Radial Growth Phase
ROCK : Rho-associated protein kinase
ROS : Reactive oxygen species
RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium
RT-QPCR : Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction
S1P : Sphingosine 1-Phosphate
S1PP : Sphingosine Phosphate Phosphatase
SDS-PAGE : Electrophorèse en Gel de PolyAcrylamide Sulfate Dodécylque de Sodium
siRNA : small interfering Ribonucleic Acid
SK : Sphingosine Kinase
SKI : Sphingosine kinase inhibitor
SLs : Sphingolipides
SMase : Sphingomyélinase
SMS : Sphingomyéline synthase
SOS : Guanine nucleotide exchnage factor
SPT : Sérine palmitoyl transférase
SSM : Superficial Spreading Melanoma
SVF : Sérum de Veau Foetal
TBS : Tris Buffered Saline
TGF- β : Transforming Growth Factor beta
THI : 2-acétyl-4-tétrahydroxybutylimidazole
TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha
TP53 : Tumor Protein 53
TPA : 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate
TRAF2 : TNF Receptor-Associated Factor-2VEGF Vascular Endothelial Growth Factor
TRP : Tyrosinase Related Protein
TSC2 : Tuberous Sclerosis Protein 2
UV: Ultra-Violet
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VGP : Vertical Growth Phase

SOMMAIRE

INTRODUCTION	12
CHAPITRE 1-LE MELANOME	12
I. Généralités sur la peau	12
I.1 La peau.....	12
I.2 Les tumeurs cutanées	15
II. Le mélanome	16
II. 1 Généralités et classification	16
II.2 Epidémiologie.....	18
II.3 Oncogenèse du mélanome cutané : les bases moléculaires	21
II.4 Diagnostic	32
II.5 Traitements	35
III. Modélisation du mélanome	45
III.1 Modèles cliniques.....	47
III.2 Modèles in vitro.....	48
III.2 Modèles in vivo	50
CHAPITRE 2- LES SPHINGOLIPIDES	53
I. Généralités	53
I.1 Structure	53
I.2 Métabolisme et distribution subcellulaire	54
II. La sphingosine 1-phosphate, un lipide bioactif	56
II.1 Métabolisme de la sphingosine 1-phosphate (S1P)	56
II.2 Localisation cellulaire et transport de la S1P.....	64
II.3 Cibles et mode d'action de la S1P	66
II.4 La S1P, un lipide aux nombreuses fonctions biologiques	70
III. Sphingosine 1-Phosphate et Cancer	73
III.1 Dérégulation du métabolisme de la S1P dans le cancer et thérapies associées	73
III.2 Les Sphingolipides et la Sphingosine 1-phosphate dans le mélanome	80
MATERIELS ET METHODES	82
I. Culture cellulaire	82
I.1 Lignées cellulaires.....	82
I.2 Transfections transitoires et stables	82
II. Etude de la résistance cellulaire au traitement par la Dacarbazine	84
II.1 Traitement par la Dacarbazine.....	84
II.2 Test de viabilité cellulaire.....	84

<i>III. Etude de la migration cellulaire</i>	84
<i>IV. Etude de la sécrétion de SIP</i>	85
<i>V. Analyse de l'expression du gène SPHK1 ou SGPL1 par RT-QPCR</i>	85
<i>VI. Analyse immunohistochimique</i>	86
<i>VII. Western Blot</i>	86
VII.1 Les anticorps utilisés.....	86
VII.2 La technique.....	86
<i>VIII. Mesure de l'activité enzymatique de la Sphingosine kinase 1</i>	87
<i>IX. Analyse de l'expression du gène BRAF par RT-PCR</i>	87
<i>X. Cytométrie en flux</i>	87
<i>XI. Analyses statistiques</i>	88
RESULTATS EXPERIMENTAUX	89
<i>I. Hypothèses de travail et objectifs de l'étude</i>	89
<i>II. Etude du métabolisme de la SIP dans les cellules de mélanome</i>	89
II.1 Profil d'expression des gènes SPHK1 et SGPL1 dans des lignées de mélanome et de mélanocytes.....	89
II.2 Profil d'expression de la SK1 dans des lignées de mélanome et de mélanocytes.....	90
II.3 Profil d'activité de la SK1 dans des lignées de mélanome et de mélanocytes.....	92
<i>III. Etude du rôle de SIP/SK1 sur la migration cellulaire</i>	93
III.1 Après variation de l'expression de SK1.....	93
III.2 Après blocage des récepteurs S1PRs.....	95
<i>IV. Etude du rôle de SK1 sur la chimiorésistance du mélanome</i>	96
<i>V. Effets de la surexpression ou de l'inhibition de BRaf sur l'expression de SK1</i>	98
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	101
BIBLIOGRAPHIE	108
TABLE DES MATIERES	120
SERMENT DE GALIEN	123

INTRODUCTION

Chapitre 1-Le mélanome

I. GENERALITES SUR LA PEAU

1.1 La peau

La peau est un constituant majeur de notre organisme et aussi l'organe le plus étendu puisqu'elle assure le revêtement du corps humain (Crickx, 2005). La structure de la peau est complexe. Elle comprend, avec ses annexes, tous les tissus histologiques sauf les tissus osseux et cartilagineux. Elle se subdivise en 4 régions superposées qui sont de la superficie vers la profondeur : l'épiderme, la jonction dermo-épidermique, le derme et l'hypoderme (Figure 1).

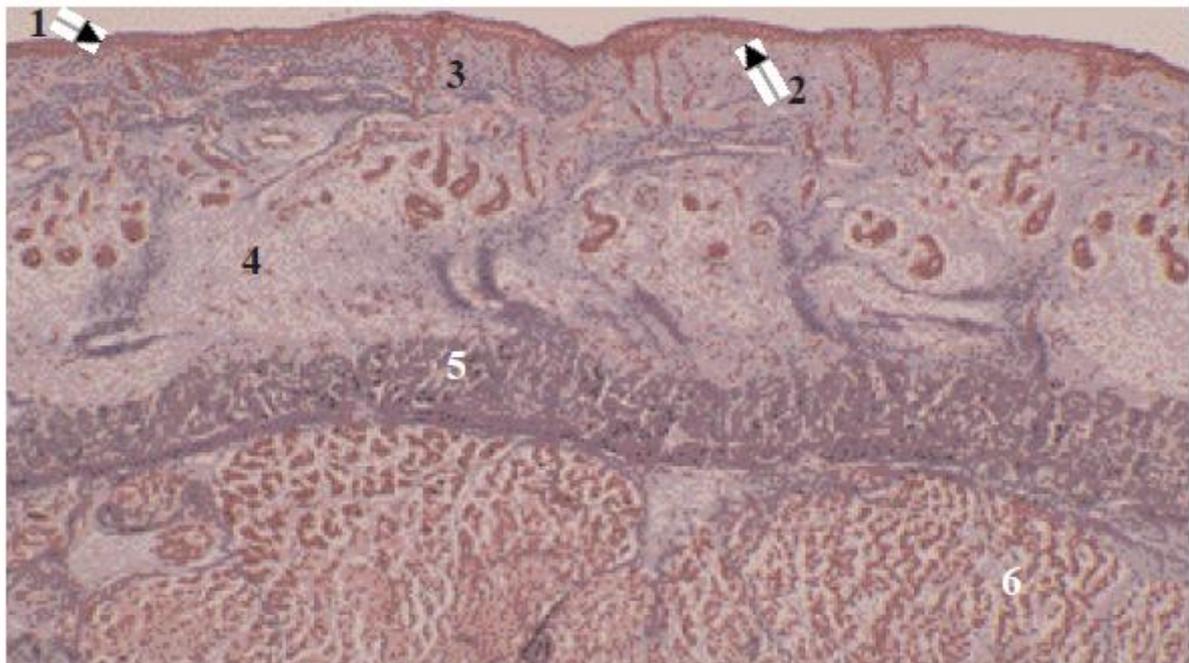


Figure 1 Les quatre régions de la peau (d'après Crickx, 2005)

1= épiderme, 2= jonction dermo-épidermique, 3= derme, 4= hypoderme et 5= aponévrose, 6=tissu musculaire

L'épiderme situé à la superficie de la peau est un épithélium de revêtement non vascularisé, stratifié, pavimenteux et orthokératosique. Il est normalement constitué de 4 types cellulaires. Les kératinocytes représentent 80% de l'ensemble de ces cellules. Ce sont eux qui en migrant, donnent à l'épiderme ses caractéristiques morphologiques c'est-à-dire une stratification en plusieurs couches et la présence en superficie de cellules pavimenteuses et anucléées. Les autres cellules de l'épiderme dispersées entre les kératinocytes sont

minoritaires (20%). Ce sont les mélanocytes, les cellules immunocompétentes (cellules de Langerhans et lymphocytes) et les cellules de Merkel (Figure 2).

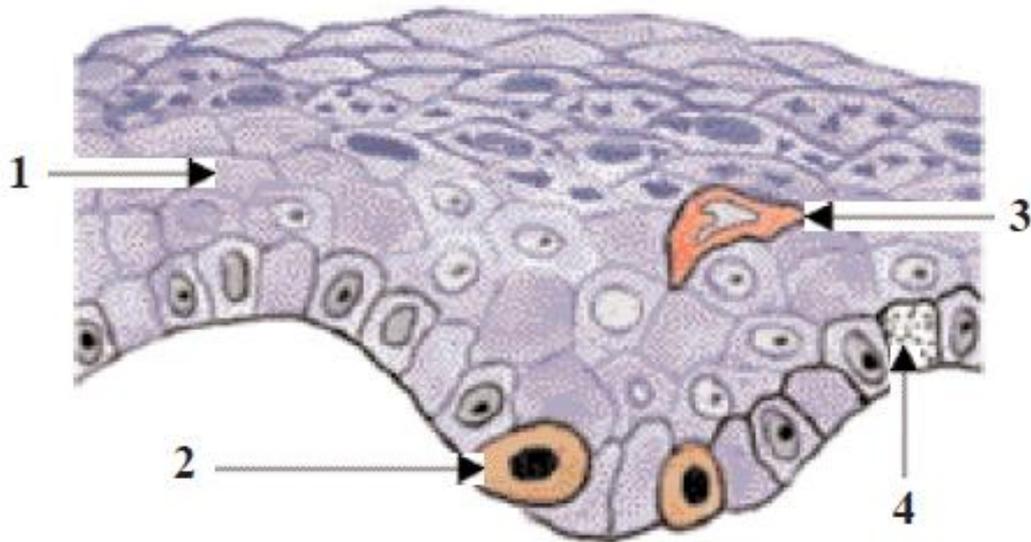


Figure 2 Les quatre populations cellulaires de l'épiderme (d'après Crickx, 2005)

1= kératinocytes, 2= mélanocytes, 3= cellules immunocompétentes, 4= cellules de Merkel

Les kératinocytes, localisés dans la couche cornée, assurent trois grandes fonctions :

- 1- la cohésion de l'épiderme avec le cytosquelette,
- 2- la fonction de barrière entre les milieux intérieur et extérieur,
- 3- et la protection contre les radiations lumineuses grâce aux mélanosomes de stade IV qu'ils ont phagocytés.

Ce rôle de barrière cutanée est permis grâce à la présence de lipides tels que des glycérophospholipides, du cholestérol ainsi que des sphingolipides, notamment des céramides, composés de très longues chaînes ω -hydroxylées (Sandhoff et *al.*, 2010).

Les mélanocytes constituent la deuxième grande population cellulaire de l'épiderme. Ils proviennent de la crête neurale et ne colonisent que secondairement l'épiderme où, à terme, ils sont exclusivement situés dans la couche basale de l'épiderme (contrairement aux mélanocytes tumoraux). Leur homéostasie (survie, différenciation, prolifération et motilité) est régulée par les kératinocytes.

Ces cellules synthétisent des mélanines : phéomélanines et eumélanines, dans des organites spécialisés, les mélanosomes qui sont ensuite transférés aux kératinocytes. Les mélanines ont à leur tour deux fonctions : d'une part, elles donnent à la peau sa "couleur" (pigmentation

constitutive), les phéomélanines étant des pigments jaunes-rouges et les eumélanines, des pigments noirs. La pigmentation constitutive s'oppose à la pigmentation "facultative" communément appelée bronzage qui apparaît après irradiation par les ultraviolets. D'autre part, elles assurent la photoprotection de la peau grâce aux eumélanines. Le bronzage correspond à une augmentation de synthèse des eumélanines, suivie d'une augmentation du nombre des mélanosomes. Finalement, lorsque l'exposition solaire se prolonge, le nombre des mélanocytes augmente. En revanche, sous l'action des radiations lumineuses, les phéomélanines sont carcinogènes. La répartition entre les phéomélanines et les eumélanines varie suivant les individus et conditionne leur phototype cutané.

Troisième population cellulaire de l'épiderme, **les cellules de Langerhans** représentent 3 à 8% des cellules épidermiques. Elles appartiennent au groupe des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T. Leur fonction est de capturer les exoantigènes par la voie des endosomes, de les apprêter et de les ré-exprimer en surface avec les molécules de classe II du CMH.

Enfin **les cellules de Merkel**, qui constituent la quatrième population cellulaire de l'épiderme, sont des cellules d'origine neuro-épithéliale ayant un rôle de mécanorécepteurs et/ou des fonctions inductives et trophiques sur les terminaisons nerveuses et les annexes cutanées (poils, ongles, glandes sudorales).

La jonction dermo-épidermique comme son nom l'indique sépare l'épiderme du derme. La complexité de sa structure et son importance fonctionnelle en font une zone à part entière.

Le derme se poursuit en profondeur par l'hypoderme sans limite franche. Tous les deux sont des tissus conjonctifs richement vascularisés et innervés. L'épaisseur moyenne du derme est de 1 à 2 mm. Il est particulièrement fin au niveau des paupières et du prépuce (0,6 mm) ; en revanche, il est très épais au niveau des paumes et des plantes (3 mm). Le derme comporte deux régions : la zone superficielle ou "derme papillaire" formée de tissu conjonctif lâche renfermant des fibres de collagène, fines, isolées et une zone plus profonde ou "derme réticulaire" formée d'un tissu conjonctif dense avec des fibres de collagène plus épaisses en faisceaux et des fibres élastiques. Le derme réticulaire contient aussi de petites artérioles et veinules, des petits nerfs, des follicules pilo-sébacés (sauf au niveau des paumes et des plantes) et les canaux excréteurs des glandes sudorales.

Dans le derme, les populations cellulaires rencontrées sont des fibroblastes, des histiocytes et des mastocytes.

L'hypoderme assure le prolongement du derme par son rôle de tissu conjonctif lâche. Sa partie la plus interne est associée au tissu adipeux. L'abondance du tissu adipeux varie selon les habitudes alimentaires mais aussi selon les régions du corps et le sexe : chez l'homme, il se situe préférentiellement en position abdominale alors que chez la femme, il est prédominant sous la ceinture, au niveau des hanches, des cuisses, des fesses ou de la partie basse de l'abdomen.

C'est donc cette structure si particulière qui confère à la peau un ensemble de propriétés telles que la protection face aux traumatismes, le recueil des stimulations sensorielles, l'élimination des déchets et la régulation de la température corporelle. Cependant la peau est en permanence soumise à des agressions extérieures pouvant provoquer des lésions en général bénignes mais parfois malignes qui peuvent donner lieu au développement de tumeurs cutanées.

1.2 Les tumeurs cutanées

Le cancer de la peau est un des cancers les plus dangereux qui tue plusieurs milliers de personnes en France chaque année. Le vieillissement de la population, l'exposition aux rayonnements UV et les coups de soleil répétés durant l'enfance sont des facteurs de risque de développer une tumeur cutanée. Ces tumeurs sont cependant regroupées en deux types de cancer : les carcinomes et le mélanome, que nous allons étudier dans la partie II.

Les carcinomes sont des tumeurs des cellules épithéliales de l'épiderme avec une localisation préférentielle sur le visage et les régions exposées aux rayons du soleil. Ils sont classés en deux types :

- **les carcinomes basocellulaires**, peu dangereux, caractérisés par une ulcération de la peau sans évolution vers une forme métastatique. Cette forme représente 80% des cancers de la peau et touche plus particulièrement des individus de plus de 40 ans à la peau claire.
- **les carcinomes spinocellulaires ou épidermoïdes**, moins fréquents (10% des cancers de la peau) et essentiellement localisés sur le visage et les mains. Leur fort pouvoir invasif se

traduit par un risque de dissémination métastatique et donc de mortalité. Les populations concernées par ce type de cancer sont les sujets blonds à peau claire.

II. LE MELANOME

Bien qu'étant la moins fréquente des tumeurs cutanées, le mélanome représente la forme la plus agressive des cancers de la peau en dépassant la plupart des tumeurs solides en termes de capacité à disséminer. A cela s'ajoutent une incidence croissante du nombre de cas de mélanome ces vingt dernières années et un nombre limité d'options thérapeutiques lorsque le cancer est à l'état métastatique. Ce cancer nécessite de développer de nouvelles stratégies de prise en charge, en s'appuyant sur une meilleure connaissance des altérations génétiques à l'origine du développement de la tumeur (Ghosh and Chin, 2009).

II. 1 Généralités et classification

En 1787, John Hunter rapporte le cas d'un homme de 35 ans, atteint d'une masse tumorale au niveau de la mâchoire, qui s'avèrera plus tard être un mélanome. Mais c'est en 1806 que René Laennec décrit pour la première fois une maladie qu'il va nommer le mélanome en raison d'un pigment, la mélanine, produite par les mélanocytes de la peau.

Le mélanome cutané est une tumeur qui se développe dans la partie profonde de l'épiderme suite à la prolifération incontrôlée des mélanocytes. Ces cellules, dérivées de progéniteurs situés au niveau de la crête neurale, sont distribuées à la jonction du derme et de l'épiderme de la peau. Leur rôle est primordial puisqu'elles produisent la mélanine, nécessaire à l'absorption des rayonnements UV, et distribuent ensuite ce pigment des mélanosomes jusqu'aux kératinocytes présents dans l'épiderme, ce qui confère à la peau une protection face aux lésions engendrées par le soleil. A noter que la quantité de mélanine produite conditionne la pigmentation de la peau. Essentiellement présents au niveau de la peau (90% des cas), les mélanomes peuvent également se développer au sein d'autres tissus : l'œil, les méninges, les muqueuses gastro-intestinale et génito-urinaire (Ibrahim and Haluska, 2009).

Il subsiste à l'heure actuelle de nombreuses interrogations concernant la pathogenèse du mélanome. L'apparition de naevi bénins ou dysplasiques (communément acquis ou congénitaux) constitue la première étape du développement tumoral. Ces lésions peuvent évoluer vers une phase de croissance radiale (RGP : Radial Growth Phase) localisée dans l'épiderme. A ce stade, les cellules restent dépendantes de facteurs de croissance et ne sont

pas encore tumorales. L'évolution vers une phase de croissance verticale (VGP : Vertical Growth Phase) caractérise l'invasion des cellules dans le derme, l'hypoderme et le tissu sous-cutané. A ce stade, les cellules se multiplient de façon anarchique et peuvent alors disséminer dans le système lymphatique pour envahir les ganglions ou dans la circulation sanguine pour atteindre les organes secondaires (Gray-Schopfer *et al.*, 2007).

Il existe une classification histologique du mélanome cutané. Quatre sous-types ont été décrits :

- le **SSM (Superficial Spreading Melanoma)** ou mélanome à extension superficielle. C'est la forme la plus commune, qui représente 70% des cas. Elle est caractérisée par une phase de croissance latérale (RGP) de 1 à 5 ans avant que le cancer ne devienne invasif (VGP). Cliniquement, l'asymétrie et les nuances de couleur ne deviennent évidentes que lorsque les lésions cutanées atteignent la taille de 1 cm. Cette forme de mélanome peut également se développer à partir d'un naevus bénin préexistant parfois situé dans une zone de la peau non exposée au soleil, d'où un diagnostic parfois plus difficile à poser. Le pronostic est conditionné par le degré d'invasivité de la tumeur et un diagnostic précoce permet l'excision de la tumeur. Les autres types histologiques restent moins répandus.

- le **NMM (Nodular Malignant Melanoma)** ou mélanome malin nodulaire qui représente 15 à 30% de tous les mélanomes. D'un point de vue clinique, son aspect est typique : pigmentation noir foncé, rarement amélanique. La phase de croissance radiale n'existant pas, la détection de ce mélanome reste difficile.

- l'**ALMM (Acral Lentiginous Malignant Melanoma)** ou mélanome malin acral lentigineux. Il s'agit du sous-type de mélanome le plus commun chez les individus à peau noire et représente 5% des mélanomes. Localisé préférentiellement au niveau de la base des ongles, de la paume des mains ou de la plante des pieds, il est en général associé à un pronostic sombre. Les formes atteignant les mains et les pieds seraient d'ailleurs liées à une évolution plus rapide de la maladie.

- le **LMM (Lentigo Malignant Melanoma)**, le mélanome malin lentigo ou mélanose de Dubreuilh. Environ 5% des mélanomes sont des LMM. Apparaissant chez des individus qui présentent des lésions dues au soleil, ce mélanome se caractérise par des formes *in situ* localisées sur la tête et le cou. La lésion cutanée est en général présente depuis plusieurs années avant que la phase de croissance verticale ne débute.

II.2 Epidémiologie

a) Prévalence, incidence, mortalité et survie

Pour mesurer l'impact du mélanome en termes de santé publique, les principaux indicateurs sont les taux de prévalence, d'incidence, de mortalité, de survie et le coût pour la société (Stratégie de diagnostic précoce du mélanome, HAS, 2006).

A ce jour, aucune étude épidémiologique française n'a permis d'estimer la prévalence du mélanome. Un taux de prévalence annuel standardisé sur l'âge a été estimé à partir des données de l'étude Europrevail. Il était en France de 30,8 pour 100 000 personnes par an et parmi les plus bas d'Europe. Par comparaison, la prévalence du mélanome en Suède et en Autriche était 4 à 5 fois plus élevée. Le classement des pays par ordre décroissant de prévalence était le suivant : Suède, Autriche, Suisse, Danemark, Finlande, Écosse, Pays-Bas, Islande, Allemagne, Angleterre, Italie, France et Espagne.

Actuellement, le mélanome cutané occupe la place de 5^{ème} ou 6^{ème} cancer le plus fréquent chez les hommes et les femmes, respectivement. Le taux d'incidence du mélanome standardisé à la population mondiale était estimé en 2000 chez l'homme à 7,6 pour 100 000 et chez la femme à 9,5 pour 100 000. Les données épidémiologiques démontrent que chaque année 133 000 nouveaux cas de mélanome cutané sont recensés dans le monde (Organisation Mondiale de la Santé) dont la majorité en Amérique du Nord, en Europe, en Nouvelle-Zélande et en Australie. En France en 2005, le nombre de nouveaux cas estimé était de 7401 (3303 chez l'homme, 4098 chez la femme) ce qui représente 2,3% de l'ensemble des cancers. Aux Etats-Unis en 2002, 53 600 nouveaux cas ont été diagnostiqués et on estime que 7400 individus décèderont de ce mélanome. Sur une période de 1980 à 2000, le taux d'incidence du mélanome pour 100 000 personnes et par an a été multiplié par 3 chez l'homme et 2,4 chez la femme. Notons cependant que cette incidence peut varier selon la zone géographique (altitude, latitude), la pigmentation de la population, le degré d'exposition au soleil et le sexe. Si l'on se fonde sur les données françaises de l'année 2000, l'âge médian des patients lors du diagnostic de mélanome était de 58 ans chez l'homme et 56 ans chez la femme. L'incidence du mélanome était plus élevée chez la femme que chez l'homme avant 65 ans (ratio H/F à 0,8), l'inverse étant observé après 65 ans. Toutefois un ralentissement de l'incidence a été observé depuis ces cinq dernières années. Certaines études suggèrent que cette légère décroissance de l'incidence serait la conséquence d'un dépistage accru du mélanome suite à des campagnes massives de prévention de la population (Tucker and Goldstein, 2003).

Le nombre de décès (hommes et femmes confondus) était estimé en France en 2002 à 1 385 dont 48 % d'hommes et 52 % de femmes. 31 % de ces décès étaient observés chez les sujets âgés de 45 à 64 ans et 58 % chez les plus de 65 ans. Le taux de mortalité standardisé sur la population mondiale était de 1,6 pour 100 000 personnes chez l'homme et 1,1 pour 100 000 personnes chez la femme. Bien que le nombre de cas incidents soit plus élevé chez la femme que chez l'homme, le nombre de décès observés chez l'homme est supérieur. Deux pistes de réflexion, que des études épidémiologiques devront évaluer, ont été soulevées : les femmes consulteraient plus tôt que les hommes pour une lésion cutanée suspecte et/ou le mélanome aurait une évolutivité plus rapide et plus sévère chez l'homme.

La mortalité due au mélanome, ayant connu une hausse entre 1980 et 2000 (+2,3% par an chez l'homme, +1,3% par an chez la femme), aurait tendance à diminuer ces dernières années. Cette observation suggère que les mélanomes identifiés dans les années 2000 sont de meilleur pronostic, hypothèse renforcée par le fait que l'épaisseur des mélanomes identifiés tend à diminuer avec les années. Cependant, à un stade avancé de la maladie lorsque les agents chimiothérapeutiques sont inefficaces, le pronostic du mélanome reste très sombre (Gremel *et al.*, 2009).

b) Les facteurs de risque

Ayant pour origine la transformation maligne des mélanocytes, le mélanome peut apparaître *de novo* ou bien résulter de la transformation maligne d'un nævus. Les données de la littérature suggèrent que 70 à 80% des mélanomes surviennent *de novo* (Rivers *et al.*, 2004). Les mécanismes d'apparition des mélanomes ne sont pas complètement élucidés. Si les études épidémiologiques ont montré qu'une exposition (UVA, UVB) cumulée pendant l'enfance à des coups de soleil détermine la susceptibilité de l'individu à développer un mélanome à l'âge adulte, celui-ci peut survenir sur des zones cutanées non exposées au soleil. D'autres facteurs de risque constitutionnels ont été décrits : les antécédents familiaux de mélanome, la présence de gènes de susceptibilité, le nombre et le type de naevi (bénins ou atypiques), le type de peau et sa pigmentation. Nous allons les examiner ci-dessous :

- Histoire familiale :

Les antécédents familiaux de mélanome sont définis par l'existence d'un mélanome soit chez deux membres apparentés au premier degré, soit chez trois membres de la famille quel que soit le degré de parenté. 5 à 10% des mélanomes surviennent dans un contexte familial. Une des méta-analyses de l'équipe de Gandini a évalué à 1,7 le risque relatif de développer un mélanome chez un sujet ayant des antécédents familiaux de mélanome

(Gandini *et al.*, 2005). L'histoire familiale est un paramètre difficile à définir car elle englobe à la fois les habitudes communes d'exposition au soleil et les susceptibilités génétiques. Les formes familiales de mélanome sont en général détectées plus précocement et à des stades moins avancés.

- Gènes de susceptibilité

Des mutations de gènes de prédisposition ont été mises en évidence dans les mélanomes familiaux. Les deux gènes les plus fréquemment mutés sont *CDKN2A* et *CDK4*, impliqués dans le contrôle de la division cellulaire. Une étude australienne a rapporté que des mutations pour *CDKN2A* étaient retrouvées chez 10,3% des personnes issues de familles à haut risque de mélanome contre 0,2% pour l'ensemble des cas de mélanomes. La probabilité de mettre en évidence une mutation pour *CDKN2A* augmente avec le nombre de cas intra-familiaux. Bien que *CDKN2A* soit un suppresseur de tumeur et *CDK4* un oncogène, une étude a montré que le risque de développer un mélanome était le même chez les porteurs de l'un ou l'autre de ces deux gènes de susceptibilité (Goldstein *et al.*, 2007). D'autres gènes ont également été associés à un risque accru de mélanome notamment *MC1R* et certains gènes impliqués dans la pigmentation. De plus, des variants *MC1R* ont été mis en évidence dans des familles mutées pour *CDKN2A*. Dernièrement, des études familiales menées sur de larges populations ont découvert de nouveaux gènes de susceptibilité, impliqués de la réparation de l'ADN et jusqu'alors peu étudiés.

- Nombre et type de naevi

Le terme de naevus désigne toute hyperplasie circonscrite et bénigne de mélanocytes. Il n'existe aucune caractéristique clinique qui puisse permettre de diagnostiquer avec certitude un naevus atypique à partir d'un naevus mélanocytaire bénin. Les naevi atypiques sont plutôt courants avec une apparition à l'approche de la puberté et restent dynamiques tout au long de l'âge adulte. Ils évoluent rarement en mélanome et sont essentiellement considérés comme des marqueurs de risque accru de développer un mélanome tout particulièrement lorsque leur nombre atteint 100 ou plus.

En ce qui concerne le type de naevus (bénin ou dysplasique), des études ont fait l'objet de controverses : à l'origine associés à la présence de gènes de susceptibilité (*CDKN2A*, *CDK4*), les naevi atypiques sont actuellement considérés comme un facteur de risque indépendant. Une étude prospective clinique menée par Rigel a conclu que les individus présentant des naevi atypiques étaient plus à même de développer un mélanome que le reste

de la population (Rigel *et al.*, 1989). Actuellement, l'étiologie des naevi reste complexe : leur développement serait dû à une interaction de facteurs génétiques et environnementaux.

- Type de peau et pigmentation

Depuis longtemps, il est reconnu que le type de peau ou phototype joue un rôle important dans le développement du mélanome. Ainsi les individus à peau claire sont plus exposés au risque de mélanome que les individus à peau foncée en raison de leur faible capacité à fabriquer des pigments bruns. Ce risque existe aussi pour les individus aux cheveux roux ou blonds, aux yeux clairs, propices aux coups de soleil. Même si la forte densité de mélanine au niveau de la peau est un facteur protecteur, les peaux foncées restent sensibles aux dommages engendrés par le soleil (Tableau 1).

Tableau 1 Risque relatif d'avoir un mélanome en fonction du phototype cutané et de l'état cutané (d'après Gandini *et al.*, 2005)

Catégories	Comparaison	Risque relatif (intervalle de confiance à 95 %)
- Densité des éphélides	- Haute <i>versus</i> basse	2,1 (1,8-2,4)
	- I <i>versus</i> IV	2,1 (1,8-2,6)
- Phototype cutané	- II <i>versus</i> IV	1,8 (1,4-2,4)
	- III <i>versus</i> IV	1,8 (1,2-2,6)
	- Verts <i>versus</i> bruns	1,6 (1,1-2,4)
- Couleur des yeux	- Noisette <i>versus</i> bruns	1,5 (1,3-1,8)
	- Bleu <i>versus</i> bruns	1,5 (1,3-1,7)
	- Roux <i>versus</i> bruns	3,6 (2,6-5,4)
- Couleur des cheveux	- Blond <i>versus</i> bruns	2,0 (1,4-2,7)
	- Châtain <i>versus</i> bruns	1,6 (1,1-2,3)
- Couleur de la peau	- Clair <i>versus</i> foncés	2,1 (1,7-2,5)

II.3 Oncogenèse du mélanome cutané : les bases moléculaires

Depuis plusieurs années, de nombreuses études se sont penchées sur les mécanismes moléculaires responsables du développement du mélanome en s'intéressant tout particulièrement aux gènes de prédisposition et en identifiant de nouvelles mutations touchant des oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs. Nous allons étudier dans cette partie les voies de signalisation ayant un rôle central dans la pathogenèse du mélanome cutané. Ces différents acteurs moléculaires sont représentés schématiquement dans la figure 3. Enfin, le tableau 2

résume les principales anomalies génétiques retrouvées dans le mélanome cutané ainsi que leur fréquence.

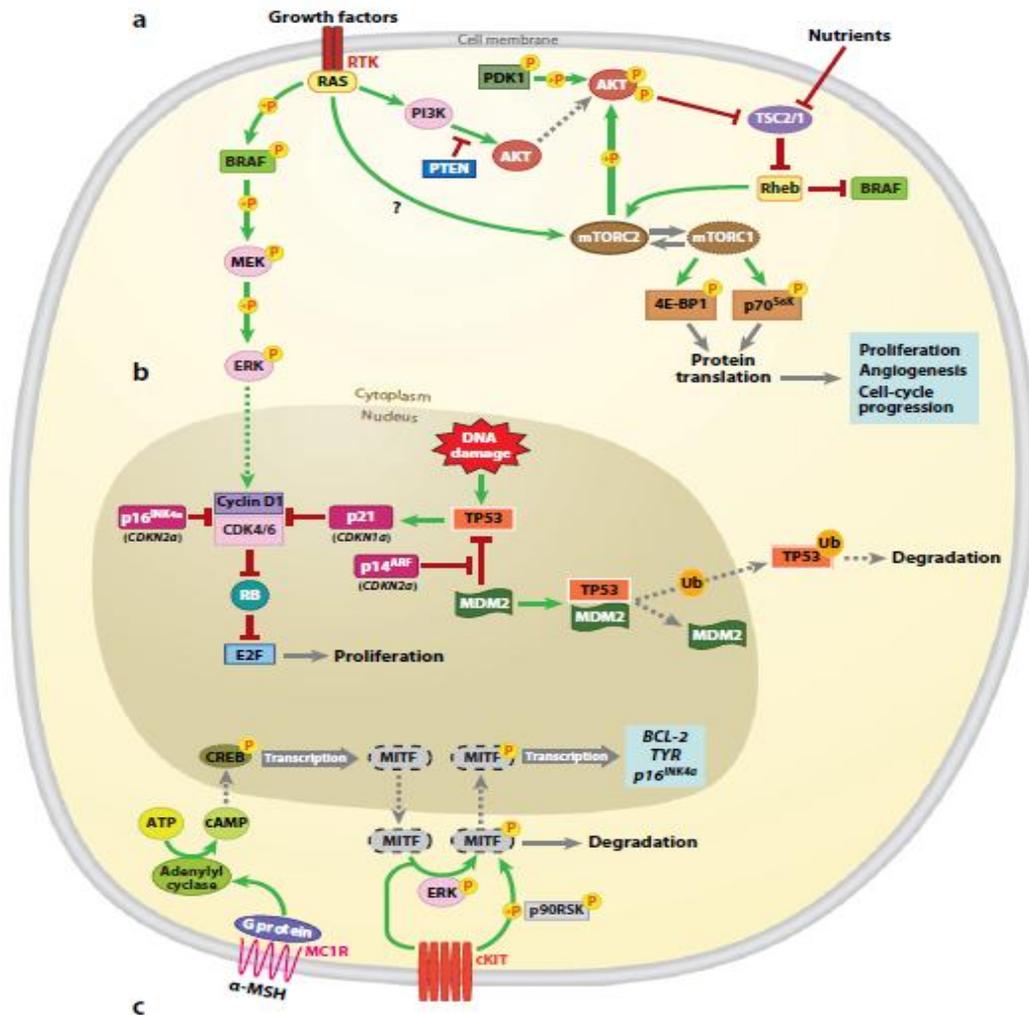


Figure 3 Les bases moléculaires dans l'oncogénèse du mélanome cutané (d'après Ibrahim and Haluska, 2009)

(a-b) Voie RTK (Recépteur Tyrosine kinase) –RAS et son rôle dans la régulation de la croissance cellulaire et la survie. L'activation de RAS initie le signal à travers deux voies, ERK et AKT. (a) Dans la voie PI3K/AKT, PTEN sert de régulateur négatif par la déphosphorylation du PIP3. L'activation d'AKT induit un changement de conformation et sa translocation à la membrane où il est phosphorylé par PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1). AKT peut aussi inhiber TSC2 (tuberous sclerosis protein 2) et activer mTORC2 (mammalian target of rapamycin C2). L'activation de la voie de mTOR conduit in fine à la prolifération, l'angiogenèse et la progression du cycle cellulaire. RAS peut aussi activer la voie des MAPKs via la phosphorylation de BRAf qui à son tour stimule MEK. Une fois activées les MEK activent ERK. La translocation de ERK au noyau conduit à la prolifération cellulaire à travers l'activation du complexe cycline D1-CDK4/6. (b) Les dommages de l'ADN conduisent à l'apoptose via la voie de la protéine p53. TP53 active CDKN1a (cyclin-dependent kinase inhibitor 1a) qui à son tour réprime le complexe cycline D1-CDK4/6 et inhibe la transcription via Rb (protéine du rétinoblastome). TP53 est inhibé par MDM2 (Mouse double minute-2) qui se lie à la protéine et induit sa dégradation par la voie de l'ubiquitine. p14^{ARF} empêche cette dégradation en séquestrant MDM2. (c) L' α -MSH (α -Melanocyte Stimulating Hormon) est le ligand du MC1R (melanocortin-1 receptor). Une fois activé, il stimule via la conversion de l'ATP en AMPc par l'adénylate cyclase, la phosphorylation de CREB (cAMP-responsive element binding protein) et induit la transcription du gène *MITF*. L'expression de *MITF*, conduit à la translocation de MITF dans le cytoplasme qui sera alors phosphorylé par ERK ou cKIT ce qui entraîne sa dégradation ou la transcription d'autres gènes effecteurs comme *BCL-2* (B cell lymphoma-2), *TYR* (tyrosinase) et *p16^{INK4}*. Les flèches vertes indiquent une activation et les flèches en T rouges une inhibition.

Tableau 2 Les altérations génétiques dans le mélanome cutané (d'après Ibrahim and Haluska., 2009)

Gene	Mechanism	Frequency
<i>NRAS</i>	Activating mutation; Q61R most common mutation	56% in congenital nevi 33% in primaries 26% in metastases
<i>BRAF</i>	Constitutive activation; V600E most common mutation	66% in melanomas 82% in benign nevi
<i>PTEN</i>	Inactivation by deletion, mutation	30–40% in cell lines 10% in primaries
<i>p16^{INK4A}</i>	Inactivation by mutation, deletion, promoter methylation	30–70% in melanomas
<i>APAF1</i>	Inactivation by loss of heterozygosity; also by methylation	42% in melanomas
<i>MITF</i>	Gene amplification	11% in primaries 15% in metastases
<i>BCL-2</i>	Gene amplification	>90% of melanomas
<i>cKIT</i>	Activating mutations; gene amplification	28% melanomas on sun-damaged skin 0–18% in benign nevi
<i>TP53</i>	Mutation or deletion	1–5% in primaries 11–25% in metastases
<i>AKT3</i>	Activation	43–67% in sporadic melanomas 4% in benign nevi
<i>mTOR</i>	Activation	73% in melanomas: 77% in situ melanomas 67% invasive melanomas 75% metastases

a) Les oncogènes de la voie des MAPKs

- La voie des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases) et RAS

Cette cascade de signalisation régule la croissance cellulaire, la survie et la différenciation et est activée par des récepteurs membranaires tels que les récepteurs à tyrosine kinase. La stimulation de ces récepteurs conduit à l'activation de petites protéines G Ras qui stimulent à leur tour la famille des Raf kinases parmi lesquelles ARaf, BRaf et CRaf. Ces trois kinases activent MEK1/2, qui à son tour active ERK1/2. ERK1 et ERK2 peuvent alors phosphoryler des protéines cibles dans le cytoplasme, ou être transloquées dans le noyau pour activer des facteurs de transcription qui régulent à leur tour des gènes de prolifération, de différenciation ou de survie (Figure 3). La voie de signalisation ERK/MAPK est depuis longtemps associée à la pathologie tumorale car le proto-oncogène **RAS** (**HRAS**, **KRAS**, **NRAS**) est muté dans approximativement 15% des cancers tandis que ERK est hyperactivée dans 30% des cancers environ. Par ailleurs, Ras se lie et active la PI3K (Phosphoinositide-3 Kinase) activant à son tour la voie d'AKT qui prévient l'apoptose.

Contrairement à d'autres tumeurs solides, les mutations activatrices de Ras ne sont pas très fréquentes dans le mélanome. Parmi les membres de cette famille, NRas est le plus

souvent muté avec un taux approchant les 56 % dans les naevi congénitaux, 33 % dans les mélanomes primaires et 26 % dans les mélanomes métastatiques. Q61R est d'ailleurs la mutation activatrice la plus fréquemment rencontrée. Certains auteurs ont suggéré que la découverte de mutations pour NRas était corrélée à la présence de métastases ou à un état avancé de la maladie. Une étude réalisée dans des mélanocytes a montré que l'association *NRAS* muté et *CDKN2A* déficient conduisait à la formation d'un mélanome cutané caractérisé par une latence courte et une haute pénétrance, capable de disséminer localement dans les ganglions ou à distance, ceci dans 30 % des cas (Ackermann *et al.*, 2005). Par conséquent, les voies contrôlées par Ras et *CDKN2A* semblent occuper une position centrale dans le contrôle des phénotypes malins.

L'oncogène BRAf est à ce jour l'effecteur cellulaire le plus important dans la genèse du mélanome.

- BRAF dans la cascade des MAPKs

La sérine-thréonine kinase BRAf est un membre de la famille des Raf kinases qui appartient à la cascade RAF/MAPK (Figure 4). Lorsque BRAf fut décrit comme un oncogène, avec 60% de mutations dans le mélanome cutané, cette découverte parut surprenante car jusqu'alors CRAf était considéré comme la seule kinase ayant un fort potentiel transformant. De plus, contrairement à CRAf, BRAf peut acquérir un pouvoir oncogénique par une seule mutation, ceci étant attribué à des régulations différentes pour ces deux kinases (Davies *et al.*, 2002) (pour revue Wellbrock and Hurlstone, 2010)

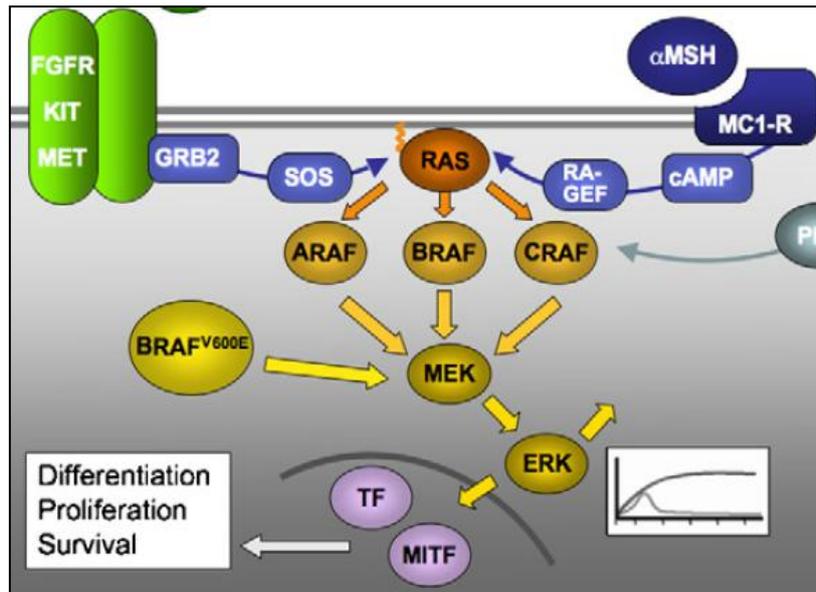


Figure 4 Rôle central de la voie ERK/MAP kinase dans la cellule mélanocytaire (Wellbrock and Hurlstone., 2010)

Les récepteurs à tyrosine kinase comme FGFR (fibroblast growth factor receptor), KIT et MET (MNG HOS Transforming gene) activent la voie des MAPKs via GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2) et SOS (Guanine nucleotide exchange factor). MC1R active Ras via l'AMPc et RA-GEF (Rap1A Guanine Nucleotide Exchange Factor). L'oncogène BRAF V600E active de façon constitutive MEK/ERK. Quel que soit le mode d'activation (transitoire versus constitutive), ERK régule différents processus dans la cellule comme la différenciation, la prolifération et la survie de la cellule.

o *Le rôle de BRaf dans le mélanome*

La première étude ayant identifié BRaf comme un oncogène dans le mélanome cutané a rapporté des mutations dans plus de 70 % des tumeurs analysées. Par la suite, d'autres études réalisées sur de plus grandes populations ont confirmé la présence de mutations avec une fréquence de 40 à 70 % (Thomas, 2006).

Durant les huit dernières années, plus de 35 acides aminés de la séquence de BRaf ont été identifiés comme des cibles potentielles de mutations dans le mélanome. Cependant, 95 % des mutations visent un seul acide aminé : il s'agit de la valine en position 600 et la substitution de ce résidu se traduit par une hyperactivation de l'activité sérine-thréonine kinase de BRaf.

Il a été observé que les mutants V600 de BRaf étaient retrouvés à tous les stades de la tumorigenèse : depuis le naevus bénin jusqu'à la tumeur métastatique, suggérant alors que les mutations activatrices de BRaf créent un avantage de croissance aux cellules mélanocytaires mais ne sont pas suffisantes pour les transformer. Dans un modèle murin où la surexpression

de BRAf V600E est limitée aux mélanocytes, les souris transgéniques présentent des lésions hyperplasiques mélanocytaires avec des caractéristiques de sénescence. Dans ce modèle, l'évolution des naevi dysplasiques en mélanome serait conditionnée non seulement par le taux d'expression de BRAf mais aussi par la perte d'expression de *CDKN2A* (Goel *et al.*, 2009). D'autres travaux ont montré que l'hyperactivation de BRAf pouvait induire la sénescence des mélanocytes (Michaloglou *et al.*, 2005). En effet, les mutations de BRAf présentes au stade de naevi bénins semblent favoriser le phénomène de sénescence de façon dépendante ou indépendante de l'activation de p16^{INK4A}, régulateur négatif du cycle cellulaire.

Des mutations de BRAf ont également été mises en évidence dans des lésions intra-épidermiques de stade RGP ainsi que dans des mélanomes *in situ* où l'expression de p16^{INK4A} était abaissée. Lorsque les cellules au stade RGP progressent vers un stade de croissance verticale ou VGP, elles acquièrent un potentiel métastatique. A cette étape-là de la tumorigenèse, une augmentation des mutations de BRAf est observée, suggérant l'implication de BRAf dans la progression et la dissémination du mélanome (Greene *et al.*, 2009).

Il existe une coopération étroite entre BRAf et la voie de la PI3K, illustrée par la fréquence élevée de mutations de BRAf coexistant avec la perte de fonction de PTEN (Tsao *et al.*, 2004). La nécessité d'une « collaboration » entre ERK/MAPK et PI3K dans la progression du mélanome *in vivo* a été démontrée dans deux études indépendantes réalisées chez la souris et le poisson zèbre (Dankort *et al.*, 2009)(Michailidou *et al.*, 2009). Par conséquent, le ciblage des voies de la PI3K et de BRAf semble une approche prometteuse qui a déjà été prise en considération dans des essais cliniques. Comme on vient de le souligner, BRAf contrôle non seulement l'initiation du mélanome mais aussi sa progression, faisant de cette kinase une cible thérapeutique importante dans le traitement du mélanome.

○ Régulation de BRAf et de son mutant

Depuis quelques années, l'étude structurale et fonctionnelle de BRAf a permis :

- de connaître le mode d'activation de cette kinase ainsi que sa régulation,
- de pouvoir prédire une réponse thérapeutique des patients atteints de mélanome,
- et de développer des inhibiteurs spécifiques du mutant V600E.

Contrairement à d'autres kinases, le domaine catalytique de BRAf présente une conformation complexe qui favorise les interactions protéine-protéine entre une boucle riche en glycine et le segment d'activation de la kinase. Lorsque ces deux zones interagissent, BRAf adopte une conformation qui rend la kinase inactive. La présence de mutations telles que

V600E ou K601E dans la boucle riche en glycine empêche l'interaction avec le segment d'activation et imite l'état de phosphorylation qui, dans les conditions physiologiques d'activation, a lieu sur les résidus adjacents à V600. La kinase entre alors dans une conformation active, permettant l'activation de MEK et par conséquent celle de ERK. Ce modèle d'activation permet d'expliquer que la majorité des mutations de BRaf soient localisées dans le segment d'activation ou la boucle riche en glycine.

Cependant, il existe une série de mutations qui n'augmenteraient pas significativement l'activité de BRaf, voire la diminueraient. L'analyse de ces mutants « intermédiaires » a abouti à la découverte d'un nouveau mécanisme cellulaire dans lequel CRaf agirait en tant qu'effecteur de BRaf (Garnett *et al.*, 2005). Dans ce cas, l'activation de CRaf par le mutant de BRaf conduit à la stimulation de la voie de signalisation MEK/ERK. CRaf serait également activé dans les cellules où l'oncogène RAS est exprimé. Dans ce cas, la survie des cellules semble sous le contrôle de la kinase CRaf via un mécanisme indépendant de la voie MEK/ERK (Karasarides *et al.*, 2004). CRaf étant connu pour activer des voies de survie autres que celle des MAPKs (Troppmair *et al.*, 2003), cette hypothèse permet d'expliquer pourquoi les cellules porteuses d'un mutant de BRaf dit « intermédiaire » sont plus sensibles à l'effet d'un inhibiteur multikinase comparé avec un inhibiteur spécifique de BRaf.

Les interactions dans la famille Raf sont complexes. C'est pourquoi l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques nécessite d'être vigilant (cf partie traitements du mélanome).

b) Les autres acteurs moléculaires

- Les gènes suppresseurs de tumeur : *PTEN*, *TP53*

PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) est un élément crucial dans la signalisation cellulaire du mélanome. Identifié comme un suppresseur de tumeur et situé sur la région chromosomique 10q23-24, le gène *PTEN* est fréquemment altéré dans les gliomes et les mélanomes. En effet, la délétion de *PTEN* a été pour la première fois décrite en 1988. Par la suite, des analyses cytogénétiques ont montré que la perte du 10q constituait un événement précoce et fréquent (30 à 40%) dans le mélanome. Lors d'études fonctionnelles, la surexpression *in vitro* de la phosphatase dans des cellules de mélanome déficientes pour *PTEN* a permis de réduire la tumorigenèse et la capacité des cellules à métastaser démontrant alors le rôle inhibiteur de *PTEN* dans le développement du mélanome (Hwang *et al.*, 2001).

Au niveau de la cellule, *PTEN* est une phosphatase agissant sur des protéines et des

lipides qui régule les niveaux intracellulaires d'un lipide, le PIP3 (phosphatidylinositol triphosphate) qui à son tour active AKT, protéine majeure dans le contrôle de l'apoptose. Parmi les mutations retrouvées dans PTEN, la C124R d'abord identifiée dans le syndrome de Cowden [maladie génétique rare, hamartomes multiples] est la plus fréquemment décrite dans le mélanome. Cette mutation, touchant au domaine phosphatase entraîne l'abolition de l'activité enzymatique. C'est à cette activité phosphatase que l'on attribue le rôle de PTEN dans la survie cellulaire. L'équipe de Stambolic a d'ailleurs montré que le knockout de *PTEN* dans les fibroblastes embryonnaires de souris réduisait leur sensibilité à l'apoptose et qu'au contraire la restauration de PTEN dans ces cellules les rendait à nouveau sensibles à la mort par apoptose (Stambolic *et al.*, 1998). Il est important de noter que la présence de mutations de PTEN (ou d'AKT) rend les mutations de NRas redondantes car toutes ces altérations conduisent à l'activation de la voie PI3K-AKT. Il existe donc une distribution mutuellement exclusive des mutations de PTEN et de NRas dans le mélanome, que ce soit dans les cellules primaires ou bien dans des lignées cellulaires.

Contrairement à d'autres types de cancers humains où les mutations de *TP53* sont très fréquentes, le rôle de ce régulateur de l'apoptose est peu connu dans le mélanome. Pour rappel, le gène *TP53* code pour une phosphoprotéine nucléaire dont les fonctions incluent le maintien de la stabilité génomique et l'induction de l'apoptose en réponse à des stimuli génotoxiques. La non-fonctionnalité de TP53 conduit à une croissance cellulaire aberrante, à la survie de la cellule et ceci favorise le phénomène de tumorigenèse. Dans la peau, on pourrait envisager que TP53 joue un rôle essentiel pour le maintien de l'intégrité génomique lorsque l'exposition aux UV provoque des dommages sur l'ADN. Malgré cela, les altérations génétiques de *TP53* dans les tumeurs mélanocytaires restent rares en comparaison avec d'autres tumeurs solides, la fréquence étant de 1 à 5 % dans les tumeurs primaires et de 11 à 25 % dans les mélanomes métastatiques. A l'heure actuelle il est difficile d'expliquer ce phénomène ; l'hypothèse la plus probable est celle de l'implication de p14^{ARF}, protéine qui contrôle les taux de la protéine codée par *TP53*. En effet p14^{ARF} empêche la dégradation de TP53 et favorise son accumulation. La présence de délétions sur le locus 9p21 conduisant à l'inactivation de p14^{ARF} serait donc liée à la faible fréquence des mutations de *TP53* dans le mélanome.

- Les régulateurs de l'apoptose : AKT, cKIT, Bcl-2

AKT joue un rôle clé dans le mélanome en favorisant la prolifération et la survie cellulaire. Pourtant aucune mutation activatrice d'AKT n'a jusqu'alors été identifiée dans ce type de tumeur. On connaît trois isoformes d'AKT ayant toutes des fonctions différentes mais c'est AKT3 qui semble préférentiellement activée dans les mélanomes sporadiques (43 à 67 %). Cette activation sélective est sans doute le résultat d'un défaut d'activation de PTEN, hypothèse appuyée par l'équipe de Stahl qui a montré que l'utilisation d'un siRNA contre AKT3 ou l'expression d'une forme active de PTEN dans des cellules de mélanome conduisaient à la majoration de l'apoptose de ces cellules (Stahl *et al.*, 2004).

Dans la cascade de signalisation, en aval d'AKT intervient mTOR (mammalian target of rapamycin), impliqué dans le contrôle de la traduction des protéines, de la formation des ribosomes, dans l'autophagie et le métabolisme. Des modèles de tumorigenèse suggèrent que les cancers dépendants d'AKT sont associés à une activation de mTOR. En effet il a été montré que l'activation d'AKT chez la souris transgénique conduisait à la formation de tumeurs sensibles à la rapamycine. De plus, mTOR est activé dans la majorité des lignées de mélanome humain (73%) alors que dans les naevi bénins ce taux est très bas (4%). Pour cette raison, ont été développés des agents dirigés contre la voie AKT/PI3K ou les effecteurs situés en aval de cette cascade de signalisation comme mTOR.

Parmi les régulateurs de l'apoptose figure **cKIT**, qui occupe une place privilégiée dans le développement des mélanocytes. Il code pour un récepteur tyrosine kinase des facteurs de croissance de cellules souches. Lorsque les facteurs de croissance se lient au domaine extracellulaire du récepteur, il se produit une dimérisation du récepteur puis l'activation de la kinase qui permet alors une autophosphorylation. De nombreuses études immunohistochimiques ont démontré un lien entre la perte progressive de l'expression de cKIT et le passage d'une lésion bénigne au mélanome primaire et métastatique. Paradoxalement, des mutations activatrices de cKIT ont été identifiées dans des lésions de mélanome. A partir de ce constat, des essais thérapeutiques utilisant l'imatinib mis en place chez des patients porteurs de mutations activatrices de cKIT se sont finalement avérés décevants. A l'avenir, de nouvelles études cliniques avec un recrutement plus strict des patients doivent être envisagées.

Bcl-2 est le chef de file d'une famille de protéines dont certaines sont anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1 ou A1) tandis que d'autres sont pro-apoptotiques (Bax, Bad). Les interactions entre ces protéines jouent un rôle central dans le contrôle du processus apoptotique. Bcl-2, situé au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, contrôle la libération de cytochrome c dans le cytosol et par conséquent régule l'activation des caspases effectrices et protège les cellules de la mort. L'oncoprotéine Bcl-2 est un puissant anti-apoptotique exprimé à la fois dans les mélanocytes sains et dans les mélanomes métastatiques. Comme c'est le cas dans les cancers hématologiques et d'autres tumeurs solides, l'expression de Bcl-2 est fortement augmentée dans plus de 90 % des mélanomes malins. A l'inverse l'inhibition de Bcl-2 par des oligonucléotides antisens sensibilise les cellules de mélanome à la chimiothérapie cytotoxique dans des modèles pré-cliniques. L'utilisation de ces antisens combinés à la Dacarbazine se traduit par une augmentation de la médiane de survie de patients ayant un mélanome à un stade avancé (Bedikian *et al.*, 2006).

- Les gènes de prédisposition dans les mélanomes familiaux : *CDKN2A*, *CDK4*, *MC1R*

Le gène *CDKN2A* est un suppresseur de tumeur situé sur le chromosome 9p21, qui code pour deux protéines p16^{INK4A} et p14^{ARF}. Via son interaction avec CDK4, p16^{INK4A} inhibe le complexe CDK4/cycline D et agit comme un régulateur négatif de la prolifération cellulaire en stoppant le cycle cellulaire en G1. p14^{ARF} intervient en inhibant la dégradation du facteur de transcription p53 en se liant à la protéine MDM2 et ceci conduit à l'accumulation de p53 (Harris *et al.*, 2005). Des mutations de *CDKN2A* ont été rapportées dans 20 à 40 % des mélanomes familiaux et sont associées à des tumeurs primaires de faible épaisseur (Holland *et al.*, 1999). Pour mieux comprendre le rôle de p16^{INK4A} dans la tumorigenèse, des modèles murins ont été développés confirmant l'effet suppresseur de tumeur de *CDK2NA*. Par exemple, l'introduction d'un mutant H-Ras chez une souris déficiente pour *CDK2NA* a conduit à la formation spontanée de mélanomes très invasifs (Serrano *et al.*, 1996).

Le gène *CDK4* code pour une sérine-thréonine kinase cycline-dépendante située sur le chromosome 12q14. Lorsqu'elle s'associe à la cycline D, elle phosphoryle et inactive la protéine Rb (Retinoblastoma protein) ce qui a pour effet de réguler l'expression des gènes nécessaires à la transition G1/S et la progression vers la phase S du cycle cellulaire. Bien que les altérations du gène *CDK4* restent rares dans le mélanome, elles rendent CDK4 insensible à l'effet inhibiteur de la protéine p16^{INK4A} ce qui aboutit à une prolifération cellulaire

incontrôlée. De plus, il a été démontré que l'association de mutations de *CDK4* et de mutations de *HRas* induisaient le développement de mélanomes après exposition aux UV (Hacker *et al.*, 2006).

Le gène *MC1R* (*Melanocortin 1 Receptor*), localisé sur le chromosome 16q24.3, est un gène de susceptibilité au mélanome de faible pénétrance qui code pour un récepteur couplé à une protéine G transmembranaire exprimé sur les mélanocytes de l'épiderme. Après fixation sur le récepteur, son ligand l' α -MSH (alpha-melanocyte stimulating hormone) ou mélanocortine stimule l'adénylate cyclase (AC) qui génère de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et ceci aboutit à la transcription du microphthalmia transcription factor (MITF) (cf paragraphe suivant), de la tyrosinase (TYR) et d'autres enzymes nécessaires à la synthèse de mélanine (Schaffer *et al.*, 2001).

Des polymorphismes de *MC1R* ont été associés aux mélanomes et aux carcinomes. Par ailleurs, dans des familles porteuses d'une mutation pour $p16^{\text{INK4A}}$, la présence supplémentaire d'un variant *MC1R* est associée à un développement de mélanome plus précoce (Box *et al.*, 2001). Enfin, il existerait une association forte entre variants *MC1R* et mutations pour *BRaf*, mise en évidence par l'étude de 2 populations caucasiennes, indépendamment d'une exposition au soleil (Landi *et al.*, 2006).

- Le gène de lignage mélanocytaire : *MITF*

MITF (Microphthalmia-associated Transcription Factor) est un facteur de transcription de la famille bHLH-LZ (basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper) dont l'isoforme M est spécifique des mélanocytes. *MITF* est considéré comme un gène majeur pour le développement et la survie de ces cellules et comme un facteur de transcription clé pour réguler l'expression de protéines comme TYR et TYR-related protein (TRP). Une autre fonction de *MITF* est liée à la pigmentation des mélanocytes. Son expression est stimulée par l' α -MSH, hormone sécrétée par les kératinocytes en réponse aux UV. Lorsqu'elle interagit avec *MC1R*, cela active des voies de signalisation intracellulaires dépendantes de l'AMPc et conduit à l'activation de *MITF* qui va ainsi se fixer sur les promoteurs des enzymes de la mélanogenèse.

La régulation de ce facteur de transcription est sans aucun doute complexe. Selzer *et al.* ont montré l'existence d'une diminution des taux de *MITF* dans des mélanocytes

transformés spontanément et un ralentissement de la tumorigenèse lorsque l'isoforme M exogène était surexprimée dans ces cellules (Selzer *et al.*, 2002). De plus, une faible expression de *MITF* dans les mélanomes semble corrélée à un mauvais pronostic (Salti *et al.*, 2000). Par ailleurs, MITF semblerait promouvoir la survie des mélanocytes par une régulation positive de Bcl-2.

L'expression de *MITF* varie selon le type de tumeur et seulement 10 à 20 % des mélanomes présentent une amplification de ce facteur de transcription, avec une incidence plus élevée dans les lésions métastatiques. D'autres études ont montré que BRAf pouvait réguler négativement les taux de *MITF* via sa phosphorylation médiée par ERK (Wellbrock and Marais, 2005). A l'opposé, il a été décrit que la mutation V600E de BRAf était associée avec une amplification de MITF dans 10 % des mélanomes (Garraway *et al.*, 2005). Ces observations contradictoires sont encore mal explorées et pourraient être liées à la présence de différentes classes de mélanome.

II.4 Diagnostic

L'identification d'un mélanome est réalisée par l'examen clinique de la peau du patient en s'aidant ou non de la dermoscopie. La dernière étape qui vient confirmer le diagnostic est l'examen anatomo-pathologique.

L'examen clinique a pour objectifs d'identifier toute lésion cutanée pouvant faire évoquer un mélanome ou être susceptible d'évoluer vers un mélanome. La deuxième étape consiste à évaluer les facteurs de risque du patient. L'examen clinique est effectué sur l'ensemble du revêtement cutané du patient (sans oublier les plis et les espaces interdigitaux). Les éléments pris en compte seront : le nombre et la forme des lésions mélanocytaires, leur disposition, leur topographie, leur distribution et leur étendue (Figure 5).



Figure 5 Différents aspects de mélanome (d'après <http://scientiaconnaissance.blogspot.com/2010/02/cancer-de-la-peau.html>)

L'analyse sémiologique d'une lésion cutanée pigmentée suit la règle ABCDE décrite par Friedman (Friedman *et al.*, 1985). Un mélanome se présente en général sous forme d'une lésion asymétrique (A), à bords (B) irréguliers, de couleur (C) hétérogène allant du brun clair au noir foncé. Des zones blanches où le pigment a disparu, des zones rouges inflammatoires ou des zones cicatricielles qui apparaissent bleutées peuvent également être observées. Un changement de la taille ou du diamètre (D) mais aussi de la forme ou de l'épaisseur (E) est un marqueur d'évolutivité. Une règle, dérivée de la règle ABCDE, dite « règle des 7 points du groupe de Glasgow » (Mackie *et al.*, 1989) prend en compte 3 critères majeurs, 4 critères mineurs, et donne une place prépondérante au concept d'évolution. Les critères majeurs sont les suivants : 1) changement de taille dans une lésion connue ou croissance d'une nouvelle lésion ; 2) changement dans la forme de la lésion ; 3) changement dans la couleur de la lésion. Les critères mineurs sont les suivants : 1) plus grand diamètre >7 mm ; 2) inflammation ; 3) présence d'une ulcération ou d'un saignement ; 4) changement dans la sensibilité de la lésion.

Afin de compléter l'examen clinique, limité notamment dans l'identification des mélanomes à un stade précoce, la dermoscopie est une technique de microscopie de surface (ou « microscopie en épiluminescence ») qui permet l'observation des structures pigmentaires internes de l'épiderme, de la jonction dermo-épidermique et des premières couches du derme. La dermoscopie augmente la performance du diagnostic différentiel entre une lésion pigmentée mélanocytaire et non mélanocytaire. Cette technique a une sensibilité et une spécificité élevées.

L'examen anatomo-pathologique permet d'infirmier ou de confirmer le diagnostic clinique et apporte des éléments pronostiques indispensables au clinicien. Actuellement l'épaisseur tumorale est un des indicateurs les plus employés pour évaluer le pronostic. Deux systèmes sont couramment utilisés :

- l'indice de Breslow, qui mesure l'épaisseur de la tumeur (en millimètres), reste à ce jour l'indicateur pronostique le plus prédictif du développement de métastases. C'est aussi un élément déterminant pour évaluer la survie à 5 ans après une résection chirurgicale (Tableau 3).

Tableau 3 Relation entre la survie, le stade du mélanome et l'indice de Breslow (d'après l'American Joint Committee on Cancer, Balch *et al.*, 2004)

Stade du mélanome	Indice de Breslow (mm)	Taux de survie à 5 ans [§] (%)	
		Mélanome non ulcéré	Mélanome ulcéré
- T1	- < 1,0	- 95	- 91
- T2	- 1,0 à 2,0	- 89	- 77
- T3	- 2,0 à 4,0	- 79	- 63
- T4	- > 4,0	- 67	- 45

(§) = Données issues du suivi des patients et de l'analyse de 30 450 mélanomes. Les stades T1, T2, T3, T4 correspondent à la classification TNM (annexe 3). Dans la classification de l'AJCC (cf. annexe 3), un mélanome de stade I est T1N0M0, un mélanome de stade II est T2N0M0, un mélanome de stade III est T3N1à4M0 et un mélanome de stade IV est tous T, tous N, M1 (métastases à distance).

- l'indice de Clark, qui mesure le degré de pénétration du mélanome à travers les quatre couches anatomiques de la peau.

En 2002, l'American Joint Committee on Cancer a réévalué la classification des mélanomes par le système TNM. Ce système, utilisé pour la plupart des tumeurs solides considère la taille tumorale et le degré d'invasion locale (T) ; le nombre, la taille et la localisation des ganglions lymphatiques (N) et la présence de métastases à distance (M). Ce système prend aussi en compte l'épaisseur de la tumeur primaire (indice de Breslow) et le degré d'invasivité en profondeur (indice de Clark). Ce système ne permet pourtant pas de classer certains sous-groupes de mélanomes, qui malgré un faible indice de Breslow présentent un haut risque de métastase. D'autres critères ont donc été proposés afin d'améliorer le score pronostique. Le nouveau système prend donc en compte l'épaisseur du mélanome (en millimètres) qui évalue la croissance verticale de la tumeur, la présence d'ulcération, la mise en évidence de métastases « en transit », le nombre de ganglions envahis, la localisation des métastases (tissus mous, poumons, foie et cerveau), et l'élévation du taux sérique de lactate déshydrogénase.

L'évolution spontanée d'un mélanome est très variable dans le temps. Certains progressent rapidement alors que d'autres évoluent sur plusieurs années avec des régressions,

plus rarement des guérisons spontanées. En complément des paramètres clinico-pathologiques standards, il serait nécessaire de développer des bio-marqueurs pour dépister les patients à haut risque de métastases (Gray-Shopfer *et al.*, 2007).

II.5 Traitements

Même s'il représente moins de 10% des cancers de la peau, le mélanome cutané est responsable de 80% des décès par tumeur cutanée et la survie à 5 ans des patients atteints d'une forme métastatique du mélanome est seulement de 7 à 20%. La stratégie thérapeutique de prise en charge du mélanome sera fonction de sa localisation et du stade d'évolution de la tumeur (pour revue, Algazi *et al.*, 2010).

a) Résection chirurgicale d'un mélanome primaire

La chirurgie est le traitement de première intention du mélanome et le seul traitement curatif des mélanomes primitifs. Elle permet d'effectuer un examen anatomo-pathologique. A un stade précoce de la maladie, la tumeur pourra être retirée dans sa totalité, en respectant les marges d'exérèse de sécurité qui dépendent de l'épaisseur de l'infiltration tumorale. Les dimensions des marges d'exérèse reposent sur la détermination de l'indice de Breslow après exérèse du mélanome et sont comprises entre 1 et 3 cm selon les recommandations françaises. Pour des tumeurs de moins de 1mm, l'ablation chirurgicale est hautement efficace permettant la survie dans plus de 97% des cas (Balch *et al.*, 2003). La survie à 5 ans des patients est inversement proportionnelle à l'épaisseur du mélanome (indice de Breslow) au moment de son exérèse et à l'existence ou non d'une ulcération : 45% pour un mélanome de stade T4 (classification TNM) avec ulcération et 95% pour un mélanome de stade T1 sans ulcération. Une biopsie du ganglion sentinelle sera réalisée afin de déterminer si un évidement ganglionnaire est nécessaire dans le cas où celle-ci serait positive. De même, la recherche de métastases à distance sera déterminante dans la prise en charge et le pronostic de la tumeur.

b) Traitement post-opératoire chez des patients à haut risque de récurrence

- La radiothérapie

La radiothérapie est rarement employée dans le traitement des mélanomes primaires mais est réservée à des patients présentant un envahissement ganglionnaire chez qui la chirurgie n'est pas possible. Elle est utilisée dans le but d'empêcher une récurrence locale au niveau de la zone irradiée. Dans un essai récent qui évaluait l'effet d'une radiothérapie chez 248 patients, les résultats ont montré une baisse de l'incidence des rechutes locales sans

impact sur l'incidence des métastases à distance (Henderson *et al.*, 2009). Ce traitement serait le plus approprié lorsque la présence d'une récurrence locale est associée à un haut degré de morbidité. La radiothérapie peut constituer un traitement local si elle est utilisée dans le cas de métastases cérébrales ou osseuses.

- Interféron alpha-2b

De nombreux essais cliniques ont conclu que l'administration de fortes doses d'interféron alpha-2b chez des patients atteints de mélanome aux stades II et III (cf Tableau 3) permettait de réduire le risque de récurrence et d'augmenter la médiane de survie sans rechute. A ce jour, l'interféron alpha-2b est le traitement de choix des formes de mélanome à haut risque de rechute.

- GM-CSF

De récentes études suggèrent que l'utilisation de facteurs de croissance hématopoïétiques tels que le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) peut aussi réduire le risque de récurrence du mélanome après chirurgie avec moins d'effets indésirables que l'interféron alpha-2b. Le GM-CSF agit en modulant le système immunitaire en particulier la prolifération des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes et en stimulant les monocytes et macrophages. Un essai mené durant 3 ans chez 98 patients opérés d'un mélanome (stades II, III ou IV) a montré que la médiane de survie à 5 ans dans la cohorte qui recevait le GM-CSF était supérieure d'environ 50 à 60 % (Spitler *et al.*, 2009).

c) Prise en charge des formes localement avancées et des métastases en transit

Les métastases en transit sont le plus souvent sous-cutanées, parfois intramusculaires. Alors qu'une exérèse locale de métastases en transit isolées est souvent possible, cette approche n'est plus à envisager lorsque la maladie s'étend au niveau cutané (Figure 6).



Figure 6 Métastases en transit non opérables (d'après Algazi *et al.*, 2010)

D'autres modalités thérapeutiques sont alors proposées :

- Immunothérapie locale

L'administration locale d'immunomodulateurs a conduit à la régression des métastases cutanées dans plusieurs essais de phases II. Dans une étude, l'administration intra-lésion d'interleukine-2 deux à trois fois par semaine chez 24 patients présentant une ou plusieurs métastases cutanées a permis une réponse complète chez 65% d'entre eux et des réponses partielles chez 21%. Aucune récurrence des lésions entièrement traitées ne fut signalée, cependant l'apparition de métastases viscérales a été observée chez 9 patients sur 16.

L'interleukine-2 intra-lésion a également été administrée en association avec de l'imiquimod (agoniste du Toll-like récepteur 7) donnant une régression complète dans 40,7% des lésions traitées (Green *et al.*, 2007).

Récemment, une nouvelle approche thérapeutique basée sur l'immunothérapie génique par électroporation a été testée dans une étude de phase I. Le plasmide codant pour l'interleukine 2 a été injecté dans les lésions de mélanome chez 24 patients à des stades III ou IV, suivi immédiatement de l'électroporation. Sur l'ensemble des patients, 19 présentaient des métastases à distance qui n'ont pas régressé avec ce traitement ; certains patients ont cependant répondu complètement à cette nouvelle thérapeutique.

- Perfusion d'un membre isolé

Cette option thérapeutique est privilégiée dans la prise en charge des métastases isolées à l'extrémité d'un membre. Dans cette procédure, les principales structures vasculaires sont isolées ce qui permet d'administrer l'agent thérapeutique (Melphalan ou TNF-alpha) à

des doses qui ne pourraient pas être tolérées en systémique. Les réponses semblent être transitoires avec un taux de survie sans progression estimé entre 9 et 12,4 mois. De plus la toxicité reste relativement élevée (Cornett *et al.*, 2006).

- Radiothérapie externe hyperthermique

C'est un traitement optionnel préconisé lorsque les métastases en transit ne sont pas opérables.

d) Prise en charge des formes disséminées

Dans les formes avancées, une faible minorité de patients répond aux traitements standards et la durée des réponses reste très variable. Pour ces raisons, de nouvelles molécules sont à l'heure actuelle en essais. Dans cette partie, nous mentionnons l'ensemble des options thérapeutiques qui sont à ce jour proposées aux patients atteints de formes métastatiques.

- Résection chirurgicale

Peu de patients sont concernés mais il arrive que la chirurgie soit proposée lorsque l'étendue des métastases est limitée. Une étude rétrospective a montré que la résection chirurgicale de métastases isolées au niveau du foie augmentait la médiane de survie des patients de 19 à 28 mois (Herman *et al.*, 2007). Cependant dans ce type d'étude il existe très souvent un biais de sélection.

- Interleukine 2 à fortes doses

L'interleukine 2 est un puissant immunomodulateur qui stimule l'activation et la prolifération des lymphocytes T. Un traitement par de fortes doses d'interleukine 2 entraîne une réponse tumorale objective chez une minorité de patients mais ceux dont le mélanome est limité au tissu sous-cutané semblent mieux répondre à ce traitement. Les candidats au traitement par de fortes doses d'interleukine 2 sont en général jeunes, en bon état général car un suivi intense est nécessaire lors de la mise en place de ce traitement. La toxicité de l'administration de fortes doses d'interleukine se manifestera principalement par une hypotension, une oligurie, une insuffisance rénale, une atteinte hépatocellulaire, des œdèmes, une dépression respiratoire, de la fièvre, un prurit, des diarrhées, un choc septique pouvant entraîner la mort. Des données récentes suggèrent que la vaccination contre l'antigène peptidique gp100 potentialiserait l'effet des fortes doses d'interleukine 2 en améliorant le taux de réponse de 9,7% à 22,1% (Schwartzentruber *et al.*, 2009). D'autres études sont toujours en cours.

- Anticorps anti-CTLA4

L'utilisation d'anticorps anti-CTLA4 s'est imposée comme une nouvelle stratégie dans la prise en charge des mélanomes avancés. Dans le système immunitaire, les cellules présentatrices d'antigènes présentent un fragment d'antigène au CMH et une seconde protéine de surface nommée B7 va alors jouer le rôle de co-stimulateur pour les lymphocytes T. La protéine de surface CTLA4 entre en compétition avec le CD28 et sa liaison à la protéine B7 inhibe la prolifération des cellules T et l'élaboration d'une réponse immune. Les anticorps anti-CTLA4 ont donc été développés pour empêcher ces interactions inhibitrices et pour favoriser la réponse immune. Les essais de traitement par ipilimumab, l'anti-CTLA4, dans des formes de mélanome avancé ont donné de modestes résultats (Hamid *et al.*, 2008). La réponse semble être dose-dépendante ce qui implique une certaine toxicité lorsque les posologies sont plus élevées.

- Transfert adoptif de cellules

Le transfert adoptif de cellules est une technique dans laquelle les lymphocytes spécifiques du mélanome sont identifiés, puis prélevés chez le patient et mis en culture cellulaire. Le patient reçoit une chimiothérapie de conditionnement pour créer une lymphodéplétion et permettre une meilleure réexpansion du greffon après sa réinjection. Si les premiers essais cliniques de transfert adoptif remontent à une vingtaine d'années, ce n'est que récemment que des progrès significatifs en termes de réponse clinique ont été réalisés. Une telle approche a permis d'obtenir un taux de réponse clinique de plus de 50% chez des patients métastatiques, faisant de cette approche le traitement le plus efficace à l'heure actuelle, toutes modalités confondues (Rosenberg *et al.*, 2008).

- La chimiothérapie dans le mélanome métastatique

Malgré plusieurs essais d'agents cytotoxiques en chimiothérapie, les résultats n'ont fourni qu'une amélioration de la réponse tumorale objective ou une stabilisation de la maladie mais aucune de ces tentatives n'a pu démontrer d'allongement de la survie. Seule la Dacarbazine (DTIC), un agent alkylant, reste à ce jour la principale molécule prescrite dans le traitement du mélanome métastatique avec une réponse objective estimée entre 5,5% et 20% et des réponses complètes décrites dans 1 à 2% des cas (Middleton *et al.*, 2000)(Hill *et al.*, 1984). Les essais de polychimiothérapie associant Dacarbazine-Cisplatine-Vinblastine ou Dacarbazine-Cisplatine-BCNU-Tamoxifène ne se sont pas avérés plus efficaces que la Dacarbazine seule malgré une toxicité majorée.

L'autre molécule de référence dans le traitement des formes métastatiques est le Témolozomide qui n'est autre que l'analogue biodisponible de la Dacarbazine. Cet agent cytotoxique offre l'avantage de la prise par voie orale qui présente un confort pour le patient sans perturber la bonne distribution de la molécule dans le système nerveux central. Des études comparatives entre la Dacarbazine et le Témolozomide ont conclu que la réponse à ces deux agents thérapeutiques ne différait pas en termes de survie globale et sans progression même si la forme orale diffuse moins bien dans le système nerveux central.

D'autres schémas thérapeutiques ont été testés avec notamment le Paclitaxel, un poison du fuseau mitotique, en association avec l'agent alkylant le Carboplatine. Malheureusement les taxanes comme le Paclitaxel ont une faible pénétration dans le système nerveux central ce qui limite leur utilisation chez les patients ayant des métastases au cerveau. Par ailleurs cette classe thérapeutique est sujette au développement de mécanismes de résistance avec notamment la surexpression du transporteur Multidrug Resistance-1 (MDR-1).

Les Epothilones constituent une nouvelle classe de molécules cytotoxiques proches des taxanes et dans laquelle on retrouve la Sagopilone, molécule entièrement synthétique. Cette Epothilone de 3^{ème} génération permet de s'affranchir du phénomène de résistance de type MDR-1 tout en maintenant une bonne diffusion à travers la barrière hémato-encéphalique. Tout d'abord énoncée dans un modèle de xénogreffe avec présence de métastases cérébrales, l'efficacité de la Sagopilone a été confirmée dans un récent essai de phase II chez 35 patients ayant des formes avancées de mélanome non opérables. Avec une réponse complète, trois réponses partielles et huit stabilisations de la maladie, cet essai a montré que la nouvelle molécule cytotoxique semblait avoir un avenir prometteur dans la prise en charge du mélanome.

e) Les thérapies émergentes ou thérapies ciblées

Depuis une dizaine d'années, de nouvelles thérapies anticancéreuses ont été conçues pour agir le plus sélectivement possible sur une étape clé de l'initiation ou de la progression tumorale. On emploie le terme de thérapie ciblée pour les désigner. Face à la survenue de toxicité aiguë digestive ou hématologique, la stratégie a été de chercher des traitements qui épargneraient les cellules hôtes et agiraient principalement sur les cellules cancéreuses. Par exemple, cela a mené à l'utilisation de l'hormonothérapie dans les cancers du sein ou de la prostate qui sont deux cancers hormonodépendants. Pour être efficace, il est donc

théoriquement nécessaire de vérifier la présence et l'activation de la cible ainsi que de contrôler l'efficacité grâce à la recherche de critères prédictifs de réponse.

Le mélanome est une pathologie génétiquement complexe qui requiert une très bonne compréhension des phénomènes biologiques à l'origine de l'initiation et de la progression de ce cancer. En développant le séquençage de gènes pour l'analyse de mutations et la recherche d'oncogènes, certaines voies de signalisation cruciales ont pu être identifiées (Figure 7). Tous les oncogènes ne sont pas des cibles potentielles mais les enzymes telles que les kinases, les protéases et les phosphatases ont un intérêt majeur car leur site catalytique profond permet une meilleure sélectivité des molécules conçues par drug design (pour revue Gray-Shopfer *et al.*, 2007).

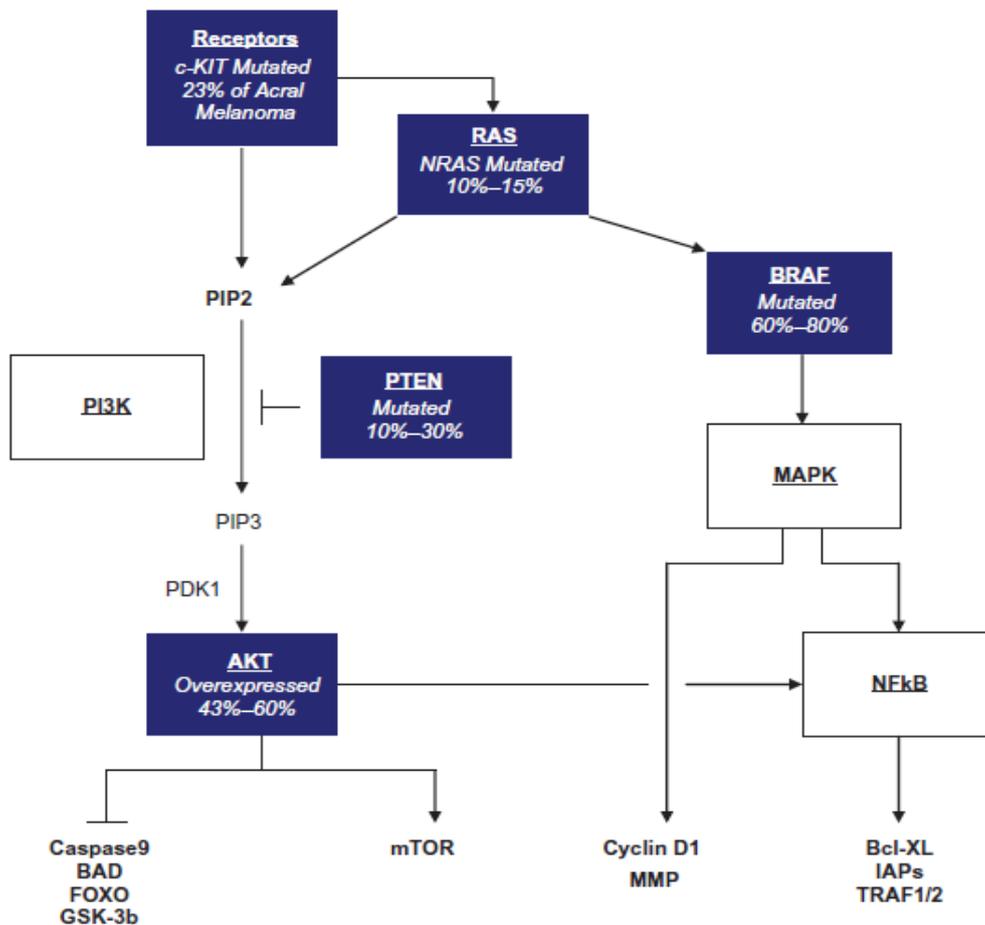


Figure 7 Les voies de signalisation activées dans le mélanome (d'après Algazi *et al.*, 2010)

- Les inhibiteurs multikinases

Parce que NRas et BRAf sont des cibles thérapeutiques validées dans le mélanome, il n'est pas étonnant que les agents qui visent cette cascade de signalisation soient rapidement entrés dans les phases cliniques comme les inhibiteurs de farnésyl transférase bloquant les modifications post-traductionnelles de Ras (Tableau 4). Malgré leur manque de spécificité, ces inhibiteurs ont été associés avec le Cisplatine.

L'inhibiteur multikinase Sorafenib (BAY 43-9006) conçu initialement pour inhiber BRAf et CRAf, semble également bloquer les récepteurs tyrosine-kinase au VEGF et au PDGF. En monothérapie, l'activité anti-mélanome du Sorafenib reste modeste mais lorsqu'il est combiné au Carboplatine et au Paclitaxel, les résultats se sont avérés plus encourageants. L'inefficacité du Sorafenib en monothérapie n'est pas bien expliquée : il s'agirait peut-être d'un mécanisme d'échappement lié à l'activation d'autres voies de signalisation que Raf/MEK/ERK ou des mécanismes de survie médiés par le TNF α . Bien que BRAf semble la cible préférentielle des drogues dirigées contre les Raf kinases, il ne faut pas négliger l'importance de CRAf dans le mélanome. En effet, lorsque Ras est muté, ce n'est pas BRAf mais CRAf qui active les MEKs suggérant alors que les thérapies anti-Raf non spécifiques seraient de meilleurs agents anti-mélanome que les molécules inhibant spécifiquement BRAf.

Par la suite ont été développées des molécules dirigées plus spécifiquement contre MEK telles que PD0325901 et AZD6244 (Tableau 4) offrant alors une nouvelle option thérapeutique. Ces agents sont capables d'inhiber *in vitro* la prolifération, la formation de colonies en agar et l'invasion dans le matrigel de cellules de mélanome portant la mutation BRAf V600E mais aussi d'empêcher le développement tumoral dans des modèles de xénogreffes (Collisson *et al.*, 2003). A noter que les cellules mutées pour BRAf semblent plus sensibles à ce type d'inhibiteurs que celles où Ras est muté ce qui suggère que Ras active des voies additionnelles rendant les cellules de mélanome moins dépendantes de MEK.

- Les inhibiteurs de la voie PI3K/Akt/mTOR

La voie de la PI3Kinase s'avère aussi être un bon candidat pour le traitement du mélanome. Des agents dirigés contre PI3K, PKB ou d'autres effecteurs situés en aval de cette cascade de signalisation comme mTOR ont été développés. Le fait que les voies Ras-ERK et PI3K/PKB contribuent toutes les deux à la survie de la cellule pourrait en partie expliquer la résistance du mélanome aux cytotoxiques classiques. Il serait d'ailleurs intéressant de tester l'association d'anti-Raf-MEK et d'anti-PI3K/PKB.

- Les oligonucléotides antisens

D'autres effecteurs cellulaires ont été pris en considération. Parmi eux, Bcl-2 présent à des taux élevés dans les cellules mélanocytaires est un facteur de survie majeur. Il protège la cellule contre les dérivés toxiques de la mélanine produits durant la mélanogenèse et contre les espèces réactives de l'oxygène générées lors d'une irradiation par les UVs. En s'appuyant sur ces données, des études précliniques et cliniques ont montré qu'il existait un réel bénéfice clinique (en termes de survie sans progression) à l'utilisation d'oligonucléotides antisens dirigés contre Bcl-2 (Oblimersen) en association avec la Dacarbazine (Bedikian *et al.*, 2006).

- Les inhibiteurs de CDK

La perte de fonctions de p16^{INK4a} est fréquente dans le mélanome. Aussi Cdk4 et 6 forment une cible thérapeutique potentielle. A ce jour les inhibiteurs de CDK non spécifiques, comme le Flavopiridol, restent inactifs sur le mélanome malin mais des inhibiteurs de Cdk4/6 comme le PD0332991 (Tableau 4) actif dans le cancer du colon, pourraient s'avérer plus efficaces. Comme pour les autres classes thérapeutiques, il s'agit de combiner ces molécules entre elles : un anti-Ras/MEK et un inhibiteur de Cdk4-6 serait une association intéressante à tester.

Tableau 4 Molécules sélectionnées pour la thérapie ciblée anti-mélanome (d'après Gray-Schopfer *et al.*, 2007)

Drug	Function	Target(s)	Study phase
BAY 43-9006 (sorafenib)	Kinase inhibitor	VEGFR, PDGFR, Raf kinases	II
CHIR-265	Kinase inhibitor	Raf kinases, VEGFR	I
PD0325901	Kinase inhibitor	MEK	I/II
AZD6244	Kinase inhibitor	MEK	II
Oblimersen	Antisense oligonucleotide	Bcl-2	III (with dacarbazine)
SU11248 (sunitinib)	Kinase inhibitor	VEGFR, PDGFR, Kit, FLT3	III (renal cancer)
SU5416 (semaxanib)	Kinase inhibitor	VEGFR	II
AG013736	Kinase inhibitor	VEGFR, PDGFR, Kit	II (renal cancer)
PD0332991	Kinase inhibitor	Cdk4/6	I (neoplasms, non-Hodgkin's lymphoma)
CCI-779 (temsirolimus)	mTOR inhibitor	mTOR, PTEN/PI(3)K/Akt pathway	II
RAD001 (everolimus)	mTOR inhibitor	mTOR, PTEN/PI(3)K/Akt pathway	I
R115777 (tibifarnib)	Farnesyl transferase inhibitor	Ras	Preclinical
PS-341 (bortezomib, velcade)	Proteasome inhibitor	NF-κB	II
BMS-345541	Kinase inhibitor	IκB	Preclinical
Vitaxin	Humanized antibody to α _v β ₃	α _v β ₃ integrin	II
EMD121974 (cilengitide)	Angiogenesis inhibitor	Integrin	II
17AAG	Hsp90 inhibitor	Hsp90	II
ZSTK474	PI(3)K inhibitor	PI(3)K	Preclinical

FLT3, FMS-like tyrosine kinase 3; PDGFR, PDGF receptor; VEGFR, VEGF receptor.

- Les inhibiteurs de cKIT

Selon le type de mélanome, la fréquence des mutations pour cKIT peut varier de 2 à 20%. Les inhibiteurs de tyrosine kinase (Sunitinib, Imatinib, Nilotinib et Dasatinib) constituent une classe thérapeutique de petites molécules ciblant cKIT, habituellement indiquées dans d'autres pathologies tumorales. Une étude réalisée sur une population non sélectionnée de patients atteints de mélanome métastatique a conclu à la faible efficacité d'un traitement par l'Imatinib (Wyman *et al.*, 2006). Cependant, dans un essai ayant sélectionné les patients porteurs de mutations pour cKIT, le traitement par Imatinib a entraîné une réponse tumorale partielle chez trois patients sur cinq et une stabilisation de la maladie pour les deux autres (Carjaval *et al.*, 2009). Même si des résistances ont été décrites chez des patients mutés pour cKIT lors d'un traitement par l'Imatinib, le Nilotinib ou le Sorafenib, de nouvelles molécules inhibitrices de cKIT sont en cours d'essais cliniques.

- L'inhibiteur de BRAF V600E : le PLX-4032

Les efforts faits pour cibler la mutation V600E de BRaf ont mené au développement d'un inhibiteur de BRaf hautement sélectif qui a déjà fait ses preuves dans de récents essais cliniques. Dans une étude *in vitro* réalisée sur des lignées cellulaires de mélanome, le traitement par PLX-4032 à la concentration de 1µM a permis de constater que treize lignées sur trente-cinq étaient sensibles au PLX-4032, seize résistantes et six intermédiaires. Ce traitement a entraîné l'inhibition de croissance, l'arrêt du cycle cellulaire et le déclenchement de l'apoptose dans les lignées sensibles, soulignant la robustesse de PLX-4032 sur les lignées mutées pour BRaf. A l'inverse une lignée cellulaire « wild-type » pour BRaf ou mutée pour NRas reste résistante à l'inhibiteur sélectif (Tap *et al.*, 2010). En effet, alors que le PLX-4032 inhibe ERK dans les cellules portant la mutation V600E, on observe au contraire une activation de cette cascade de signalisation dans les lignées sauvages pour BRaf via l'activation de CRaf (Halaban *et al.*, 2010). Ces études suggèrent la nécessité de connaître le statut mutationnel de BRaf avant toute instauration de traitement par PLX-4032.

En phase I d'un essai clinique présenté en 2009 à la réunion annuelle de l'ASCO (American Society of Clinical Oncology), il a été montré que le PLX-4032 entraînait une réduction de moitié du nombre de cellules cancéreuses sur un groupe de 16 patients avec un mélanome au stade avancé. A la dose de 240 mg par jour, le traitement par PLX-4032 conduit à un taux de survie médian supérieur de 6 mois chez les patients traités par l'inhibiteur par comparaison au groupe témoin (Flaherty *et al.*, 2009). Lors d'une seconde étude en phase I chez des patients porteurs de la mutation V600E de BRaf, une rémission partielle ou complète

a été observée chez 80% des patients environ, sur une période de 2 à 18 mois. Des essais cliniques en phase I et en phase II sont en cours et des essais en phase III ont débuté (disponible sur <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01006980?term=RO5185426&rank=3>). En juin 2011 dans le magazine *Gen News Highlights*, des résultats prometteurs ont été rapportés lors de l'étude en phase III (BRIM3) menée par Roche chez des patients porteurs de la mutation V600E de BRaf.

III. MODELISATION DU MELANOME

La transformation des mélanocytes en mélanomes au sein de l'épiderme est un phénomène évolutif en cinq étapes, décrites dans la figure 8. La prolifération des mélanocytes conduit tout d'abord à la formation de naevi qui peuvent évoluer vers une forme à l'architecture atypique. La persistance de cette population dysplasique marque le début de l'oncogenèse, avec une phase de croissance radiale des cellules (ou RGP) d'abord limitée à l'épiderme, qui s'étend ensuite au derme papillaire. L'étape suivante de croissance verticale (ou VGP) est caractérisée par la capacité des cellules à envahir le derme puis le tissu sous-cutané. Dans cette phase, la tumeur apparaît vascularisée et peut métastaser. La tumeur peut dans certains cas s'étendre localement (peau, ganglions sentinelles) ou au contraire disséminer à distance (poumon, foie, cerveau, os, intestin).

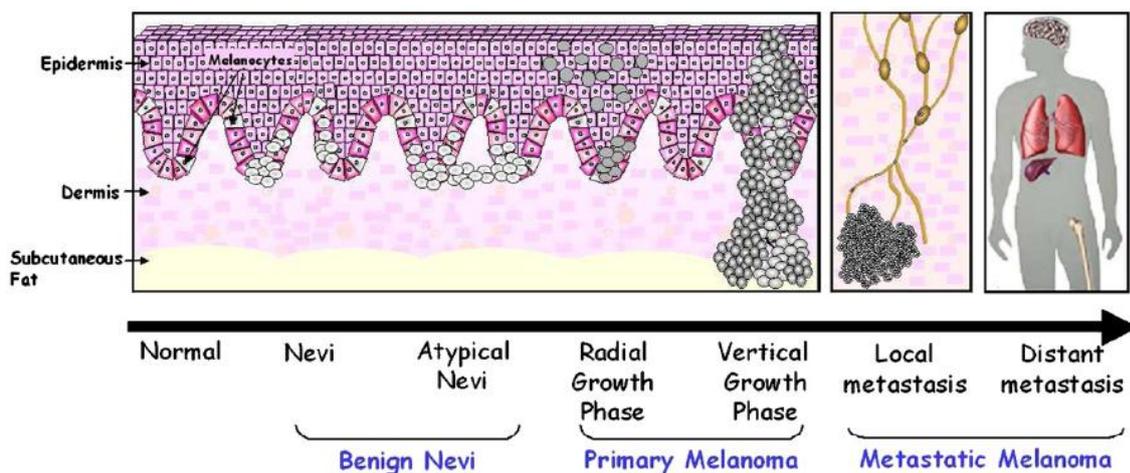


Figure 8 Modélisation de l'oncogenèse du mélanome (d'après Gremel *et al.*, 2009)

Les mélanocytes sont présents à la base de l'épiderme (en blanc). Lorsqu'ils prolifèrent, se forment alors des naevi. Des naevi atypiques peuvent être présents. La phase de RGP comprend des mélanocytes dysplasiques localisés dans l'épiderme (indice de Clark I) ou qui infiltrent le derme (Clark II). La phase de VGP (indice de Clark III à V correspond à la pénétration dans le derme et le tissu sous-cutané. Les cellules de mélanome peuvent alors envahir localement les ganglions

lymphatiques ou des sites métastatiques à distance comme la peau, les poumons, le cerveau, les os et le foie.

La modélisation du mélanome doit répondre à certains critères (Gremel *et al.*, 2009):

- le modèle doit être représentatif des caractéristiques physiopathologiques du mélanome,
- l'évolution du modèle doit mimer les différents stades de la maladie,
- le modèle doit dépendre des mêmes voies de signalisation que celles décrites en pathologie humaine,
- et la réponse aux traitements doit être applicable à l'homme.

Malheureusement, ce modèle idéal n'existe pas à l'heure actuelle pour différentes raisons : contrairement à d'autres tumeurs solides, les mélanomes primaires peuvent être très limités en taille, souvent réservés à l'analyse anatomo-pathologique, ce qui laisse peu ou pas de tissu pour l'expérimentation scientifique. Par ailleurs, la régulation des cellules de mélanome et des mélanocytes fait appel à des voies auto- et paracrines qui font intervenir d'autres types cellulaires tels que les kératinocytes et les cellules stromales. Les phénomènes observés sur des cultures de mélanomes isolés peuvent alors être difficiles à interpréter. C'est pour ces raisons que différents modèles *in vitro* et *in vivo* ont été développés. Nous allons les présenter dans ce chapitre (Figure 9).

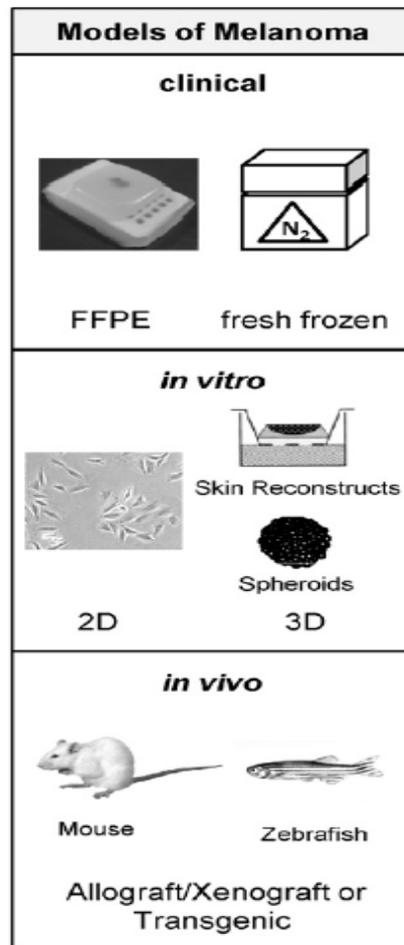


Figure 9 Représentation schématique des différents modèles d’investigation du mélanome cutané (d’après Gremel *et al.*, 2009).

III.1 Modèles cliniques

Les événements moléculaires à l’origine de la transformation des mélanocytes normaux en mélanomes malins restent à ce jour très peu connus en raison d’une diversité génétique majeure dans la physiopathologie de cette maladie. C’est pour cette raison que les études basées sur l’analyse d’échantillons pathologiques nécessitent un grand nombre de spécimens pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Malheureusement, cette condition s’avère souvent être un facteur limitant. Actuellement la création de centres régionaux ou nationaux de recherche sur le mélanome a pour objectif de permettre aux différents acteurs (cliniciens, anatomo-pathologistes, chercheurs) un accès simplifié aux banques de tissus, tout en respectant la qualité des échantillons tumoraux. Ces collaborations sont cependant très règlementées : les protocoles doivent être approuvés par des comités d’éthique, tout échantillon pathologique possède un code d’anonymat et le consentement des

patients est obligatoire. Un autre obstacle dans l'étude du mélanome concerne le mode de conservation des échantillons. En effet, les coupes de peau sont traditionnellement fixées et conservées dans un bloc de paraffine ce qui rend impossible toute analyse d'ARNm ou d'ADN chromosomique qui nécessite de travailler sur du tissu frais ou congelé et non fixé. Par conséquent, les études utilisant du matériel pathologique sont rares. Des modèles *in vitro* ont donc été conçus pour pallier ces nombreuses contraintes et limites.

III.2 Modèles in vitro

a) Culture cellulaire

La culture cellulaire reste à ce jour un moyen d'étude indispensable. Le grand nombre de lignées humaines disponibles permet d'étudier l'ensemble des stades de progression du mélanome depuis le mélanocyte sain jusqu'au stade de mélanome métastatique en passant par des lignées plus ou moins invasives (stades RGP ou VGP). Il existe même des lignées issues d'un même patient à des stades de progression différents : par exemple, la lignée WM115 au stade VGP et son variant métastatique la lignée WM266.4. La culture représente donc un moyen simple d'explorer les altérations moléculaires du mélanome. Il est également possible d'isoler chez des souris des cellules tumorales humaines à partir de métastases dans un modèle de xénogreffe de mélanome, les remettre en culture afin d'étudier leurs caractéristiques. Une alternative à l'utilisation de cellules humaines chez la souris immunodéficiente est d'injecter des cellules de mélanome murin. La lignée la plus fréquemment étudiée est la lignée B16 dont il existe plusieurs variants plus ou moins métastatiques. La lignée parentale B16 issue d'une tumeur spontanée qui s'est développée sur la peau d'une souris C57BL6, a largement été utilisée dans des études s'intéressant à la tumorigenèse, l'angiogenèse et au phénomène de dissémination des mélanomes cutanés. Malgré les avantages à cultiver à la fois des cellules humaines et animales, la croissance cellulaire dans un modèle en monoculture expose les cellules à un environnement peu naturel où les interactions cellulaires sont limitées. Ceci expose les cellules à une pression de sélection ; des cellules instables génétiquement devront par conséquent être manipulées à des passages identiques pour que les résultats d'expériences soient comparables.

b) Modèles en 2 dimensions et 3 dimensions (2D et 3D)

Depuis quelques années, l'intérêt du microenvironnement dans le développement et la progression du mélanome a fait l'objet d'un développement de nouveaux modèles *in vitro* dans le but d'étudier les interactions entre cellules de mélanome, kératinocytes, fibroblastes et cellules immunes. Des modèles de coculture (en 2D) ont pu montrer le rôle de kératinocytes indifférenciés sur la prolifération, la morphologie et la présentation des antigènes aux mélanocytes. Les kératinocytes sont aussi capables d'inverser le phénotype de cellules de mélanome à des stades précoces de transformation. Avec le développement de cultures 3D de peau organotypique, il est devenu possible de mimer le microenvironnement cutané dans un puits en plastique. Dans ce modèle, l'épiderme constitué de kératinocytes humains seuls ou associés à des mélanocytes (ou des cellules de mélanome) est situé au-dessus d'une matrice de fibroblastes primaires pris dans du collagène. Les cellules de mélanome introduites dans ce système peuvent reproduire les étapes de croissance radiale lorsqu'elles se multiplient dans l'épiderme mais aussi l'invasion lorsqu'elles envahissent le derme pour former des colonies. Ces peaux reconstruites offrent un excellent modèle d'étude des gènes impliqués dans la progression du mélanome.

Une autre approche visant à mimer le microenvironnement du mélanome est le modèle de sphéroïdes. La plupart des lignées cellulaires de mélanome adoptent une morphologie globulaire, d'amas ou de sphères lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions de non-adhérence. En soumettant les cellules à un mouvement constant, une incubation de quelques jours suffit à la formation de structures aux caractéristiques physiopathologiques et de croissance proches des tumeurs non vascularisées. Dans la périphérie du sphéroïde, les cellules sont alimentées par de l'oxygène et des nutriments ce qui les fait proliférer rapidement. Cependant le centre de la structure étant moins accessible, les cellules deviennent quiescentes et peuvent mourir formant alors un core nécrotique. L'étude comparative du profil d'expression de gènes de cellules de mélanome dans un système de monoculture ou en sphéroïdes révèle une régulation positive de gènes impliqués dans la progression et la dissémination du mélanome dans le système 3D. Il existe également une augmentation de l'expression de protéines pro-angiogéniques probablement attribuée à l'environnement hypoxique dans le centre du sphéroïde. Ce modèle s'avère donc intéressant pour l'étude de l'angiogenèse tumorale *in vitro* dans un système de coculture avec des cellules endothéliales micro-vasculaires. Une autre application possible de ce modèle est l'implantation de sphéroïdes dans un gel de collagène qui non seulement mime le microenvironnement au sein

de la tumeur mais aussi les interactions entre tumeur et matrice stromale. D'autres applications des sphéroïdes tumoraux incluent l'étude des interactions entre les cellules de mélanome et les fibroblastes environnants.

III.2 Modèles in vivo

a) Xénogreffes

Après avoir obtenu des résultats *in vitro*, il est fréquent de vouloir confirmer ces résultats chez l'animal. La démarche la plus courante consiste à injecter en sous-cutané les cellules tumorales chez des souris immunodéficientes. Bien que très répandu, ce modèle présente plusieurs inconvénients. L'injection sous-cutanée place les cellules tumorales dans un environnement artificiel qui n'est pas le reflet du site initial de développement de la tumeur et n'est donc pas un bon modèle pour étudier l'invasion et la progression du mélanome. Pour l'étude des métastases, il existe des modèles alternatifs. Traditionnellement l'injection des cellules tumorales en intraveineux (veine caudale) est l'approche la plus répandue pour étudier le phénomène de dissémination. Pourtant les cellules injectées peuvent être bloquées et détruites dans les fins capillaires des poumons ce qui rend alors difficile l'étude des métastases extra-pulmonaires et constitue une des limites de ce modèle. Pour éviter cet écueil, il est possible d'injecter les cellules tumorales directement dans le ventricule cardiaque gauche. Dans ce protocole, les métastases se forment en premier sur le squelette avant d'envahir les autres organes. Enfin, l'injection directe dans l'organe d'intérêt (glande mammaire, prostate, os) peut être une alternative.

Une des avancées majeures pour l'étude de la dissémination métastatique du mélanome est l'utilisation de l'imagerie *in vivo*. Classiquement, seul le sacrifice de l'animal permettait de visualiser l'atteinte métastatique. Maintenant, la croissance tumorale et le développement des métastases peuvent être suivis en temps réel et de manière non invasive grâce à l'utilisation de cellules fluorescentes ou bioluminescentes.

Une autre approche plus sophistiquée consiste à greffer de la peau humaine chez une souris afin d'approcher au mieux le microenvironnement physiologique. Dans les premiers essais, de la peau issue d'un donneur était directement greffée chez la souris immunodéficiente. Très utile pour étudier l'impact des radiations UV ou des carcinogènes *in vivo*, cette approche reste limitée lorsqu'on s'intéresse à des mutations de gènes spécifiques dans certaines populations cellulaires de la peau. Cet obstacle a été contourné grâce à l'arrivée des peaux reconstruites *in vitro* qui ont pu être greffées chez la souris immunodéprimée

(Lazarov *et al.*, 2002)(Khavari, 2006). L'équipe de Chudnovsky s'est servie de ce système pour évaluer les voies de signalisation impliquées dans la transformation des mélanocytes. Pour cela, des mélanocytes génétiquement modifiés (exprimant RAS muté et/ou PI3K mutée et/ou BRAF muté ou bien délétés pour Rb ou p53) ont été associés à des kératinocytes à la surface d'un derme humain et l'ensemble a été greffé chez les souris. Les résultats ont montré que l'activation de PI3K associée à l'inhibition de p53 ou Rb entraînait la formation de lésions de mélanome invasif contrairement à l'activation de BRAF seul qui ne conduit qu'à l'apparition de naevi simples (Chudnovsky *et al.*, 2005).

b) Animaux transgéniques

Le modèle animal le plus répandu est sans aucun doute le modèle murin pour plusieurs raisons : les souris ont des organes et une physiologie comparables, leur génome est bien connu et très similaire au génome humain et un grand nombre de modèles transgéniques est déjà établi. De plus, il est relativement simple d'introduire des modifications génétiques chez cet animal tout comme de tester de nouveaux agents thérapeutiques. Pour établir une lignée transgénique, deux approches sont possibles : la première consiste à intégrer une construction plasmidique dans le génome de l'hôte par un lentivirus ou une injection dans le pronucléus d'ovocytes murins fertilisés. Dans ce cas, l'expression des gènes endogènes reste inchangée. La principale application de cette technique est l'expression d'oncogènes dans des mélanocytes. La deuxième approche par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires permet d'établir des knockouts ou des modifications de gènes endogènes. Les cellules modifiées sont alors réintroduites dans des embryons murins à un stade précoce de l'embryogenèse pour intégrer la lignée germinale et donner lieu à la souris transgénique. Il est également possible de faire exprimer la ou les modification(s) génétique(s) spécifiquement dans un type d'organe ou un tissu, de façon constitutive ou inductible. Pour modéliser le mélanome par exemple, il sera intéressant de limiter l'expression du gène muté ou knockout aux mélanocytes de l'hôte. Depuis quelques années de nombreux gènes parmi lesquels *p16INK4a*, *RAS* et *HGF* ont été étudiés dans des modèles de souris transgénique (Larue and Beermann, 2007)(Benjamin *et al.*, 2007). Une des études les plus récentes s'est penchée sur le rôle de PTEN, suppresseur de tumeur, dans les mélanocytes *in vivo* (Inoue-Narita *et al.*, 2008). La délétion spécifique de PTEN dans les mélanocytes de souris protège de l'apparition de poils gris, et surtout les sensibilise à la formation de naevi et de mélanomes induite par un carcinogène. Ces résultats démontrent l'importance de PTEN dans la survie des cellules souches mélanocytaires ainsi que son rôle de suppresseur de tumeur.

Un autre modèle animal a été développé ces dernières années : il s'agit du poisson zèbre. Son génome a la particularité de posséder de nombreux gènes impliqués dans les cancers humains et qui restent conservés. Par ailleurs, c'est un petit animal qui requiert peu de soins, peu coûteux et dont les embryons transparents le premier mois de développement constituent un avantage majeur pour les techniques d'imagerie *in situ*. Récemment, une étude du rôle de l'oncogène BRAF V600E chez le poisson zèbre a montré que cette simple mutation entraînait la formation de naevi multiples dans ce modèle d'organisme aquatique et lorsqu'elle était associée au déficit en p53 conduisait à l'apparition de lésions de mélanome invasif (Patton *et al.*, 2005). Un modèle de zébrafish qui reste transparent durant toute sa vie a aussi été développé. Bien que ce modèle ne produise pas de mélanocytes, ce poisson semble déjà très intéressant pour des études d'invasion tumorale dans des modèles de xéno- ou d'allogreffes.

Chapitre 2- Les sphingolipides

I. GENERALITES

Le nom de sphingolipides (SLs) a été donné à ces molécules complexes en référence à un animal énigmatique de la mythologie grecque le sphinx. En effet, la nature de ces lipides est longtemps restée mystérieuse non seulement pour leur grande diversité de structure, leur métabolisme complexe mais aussi pour le nombre extraordinaire de fonctions biologiques qu'ils régulent. Les vingt dernières années ont été marquées par une avancée considérable dans la connaissance des SLs. Longtemps considérés comme de simples constituants des membranes ou des intermédiaires énergétiques de processus métaboliques, ils sont maintenant reconnus comme des lipides bioactifs qui jouent un rôle central dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la différenciation, la migration, l'angiogenèse ou l'apoptose (Sabourdy *et al.*, 2008).

1.1 Structure

Les sphingolipides (SLs) forment une classe de lipides complexes synthétisés dans le réticulum endoplasmique (RE) à partir de précurseurs non sphingolipidiques. Ils sont caractérisés par une structure de base à 18 atomes de carbone et une fonction amino-alcool également appelée la base sphingoïde. La condensation avec un acide gras par une liaison amide et/ou la substitution du groupement hydroxyl en C1 conduit à la formation d'une large diversité de composés (Figure 10). A partir d'une structure simple représentée par la sphingosine (base insaturée) ou la dihydrosphingosine, l'ajout par exemple d'un phosphate sur le groupement hydroxyle en C1 peut aboutir à la sphingosine 1-phosphate ou la dihydrosphingosine 1-phosphate, molécules biologiquement actives. D'autre part, la liaison de la sphingosine avec un acide gras plus ou moins long (liaison amide) donne une sphingosine N-acylée qu'on appelle plus communément céramide. Ce céramide peut avoir différentes fonctions biologiques selon la nature de la chaîne acylée qui le compose. Il se situe au centre du métabolisme des SLs et est à l'origine de la formation des SLs plus complexes via la substitution du groupement hydroxyl-1. L'ajout d'un phosphate par une céramide kinase génère du céramide 1-phosphate tandis que la condensation avec une phosphocholine conduit à la formation de sphingomyéline (SM). Enfin le céramide peut produire le glucosylcéramide (GlcCer) ou le galactosylcéramide (GalCer) par addition respective d'un glucose ou d'un galactose (Morales *et al.*, 2007) (pour revue Gault *et al.*, 2011).

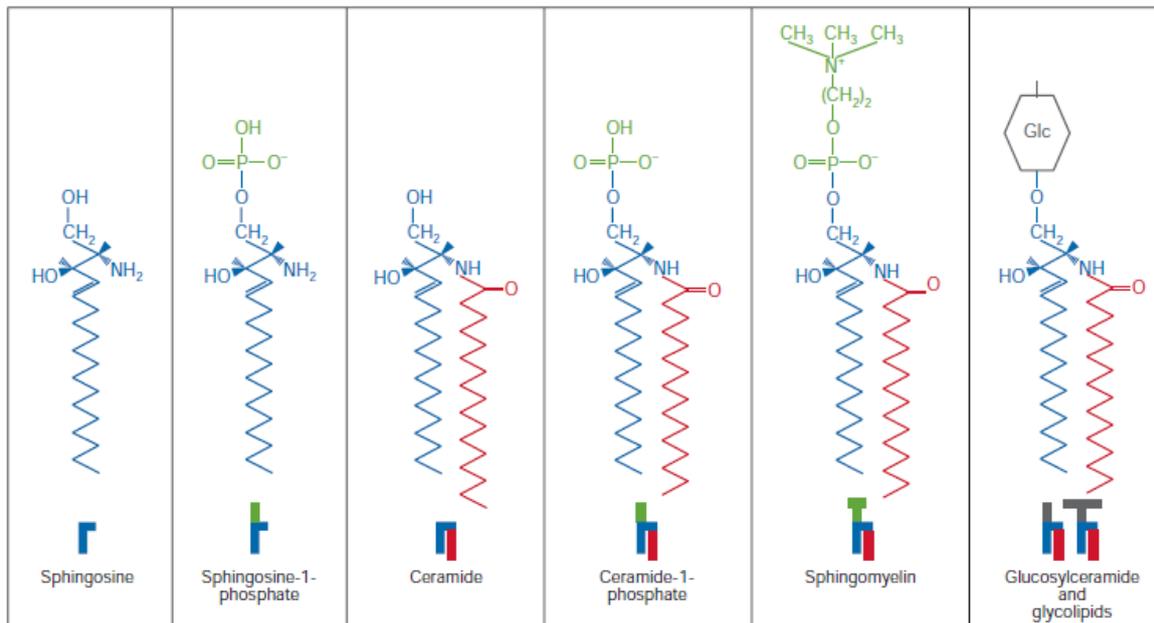


Figure 10 Structure des principaux sphingolipides (d'après Futerman and Hannun, 2004)

Avec une tête polaire hydrophile représentée par un groupement phosphate ou par des sucres greffés à l'alcool primaire et une queue apolaire hydrophobe constituée de la base sphingoïde et d'un acide gras, la plupart des SLs sont des composés amphiphiles ce qui leur permet de diffuser à travers les membranes.

Les SLs sont présents dans de nombreux organismes comme les levures, les insectes, les vers, les poissons et les mammifères. Même si la plupart des SLs sont distribués de façon ubiquitaire, certains d'entre eux sont plus abondants dans les tissus nerveux, cérébral ou cutané. Par ailleurs, bien que largement distribués dans les membranes des cellules eucaryotes, ces lipides peuvent être présents dans différents compartiments subcellulaires ou plus préférentiellement dans les liquides biologiques.

1.2 Métabolisme et distribution subcellulaire

Le céramide est généré par deux voies métaboliques (Figure 11). D'une part, une biosynthèse *de novo* initiée par la condensation entre une sérine et un palmitoyl CoA catalysée par une enzyme essentielle : la sérine palmitoyltransférase (SPT). Cette réaction débute sur la face cytosolique du RE. La 3-cétosphinganine ainsi formée va être réduite en dihydrosphingosine ou sphinganine par la cétosphinganine réductase, une enzyme NADPH dépendante. L'acylation de la sphinganine est catalysée par la dihydrocéramide synthase (CS) pour aboutir à du dihydrocéramide qui va ensuite être oxydé par une désaturase (DES) générant alors du céramide. La conversion du céramide en SLs plus complexes se déroule

dans des compartiments cellulaires autres que le RE (sauf pour le GalCer) et principalement dans l'appareil de Golgi. Le céramide doit donc être transporté dans ce compartiment par un transporteur qui est une protéine cytosolique connue sous le nom de Ceramide Transfert Protein ou CERT (Hanada *et al.*, 2007). Dans le Golgi, une sphingomyéline synthase (SMS) qui catalyse le transfert d'un groupement phosphorylcholine à partir de phosphatidylcholine sur le céramide, permet de former de la sphingomyéline (SM) qui sera transportée jusqu'à la membrane plasmique. Alternativement, le céramide, amené au Golgi par un autre mécanisme que CERT, peut être modifié en glucosylcéramide (GlcCer) par ajout de glucose sur le carbone 1 par la glucosylcéramide synthase (GCS). Le GlcCer transloque ensuite sur la face luminale du Golgi où il permettra de synthétiser des glycosphingolipides plus complexes : les gangliosides.

Le céramide peut également être généré par une voie de recyclage connue sous le nom de « cycle de la sphingomyéline ». La SM étant le SL le plus abondant dans les membranes des cellules humaines, l'homéostasie des membranes est donc sous l'influence de la synthèse et la dégradation de ce phospholipide. L'hydrolyse de la SM génère du céramide et de la phosphorylcholine. Cette réaction fait appel à des phospholipases spécifiques : les sphingomyélinases (SMases). Trois types de SMases ont été caractérisés et sont classés en fonction de leur pH optimal d'action. Il existe des SMases neutre, acide ou alcaline. Bien que ces trois groupes d'enzymes catalysent une même réaction, leurs localisations subcellulaires sont différentes. La SMase alcaline par exemple est exclusivement exprimée dans l'intestin et le foie tandis que les SMases neutre et acide sont ubiquitaires. Enfin, il semblerait que du céramide puisse être généré par des réactions d'hydrolyse similaires à partir de SLs plus complexes tels que les glycosphingolipides (Valaperta *et al.*, 2006).

Quelle que soit la voie de synthèse du céramide (*de novo* ou recyclage des SLs), celui-ci peut subir à son tour une déacylation par des céramidases (CDases). Ces céramidases possèdent une expression spécifique d'une organelle et sont classées selon leur pH optimal en CDases acide, neutre ou alcaline. Elles catalysent la dégradation du céramide en sphingosine, un lipide bioactif qui inhibe la progression du cycle cellulaire et/ou favorise l'apoptose, peut être phosphorylée par les sphingosines kinases (SK) situées dans le cytosol et donner de la sphingosine 1-phosphate (S1P), lipide mitogénique (Olivera *et al.*, 2001). Cette S1P peut être recyclée en sphingosine sous l'action d'une S1P phosphatase (S1PP) ou bien dégradée dans le RE de façon irréversible par la S1P lyase (SPL), produisant au final un hexadécénal et une phosphoéthanolamine. (Le Stunff *et al.*, 2002)(Bandhuvula *et al.*, 2007).

Bien que le céramide soit majoritairement converti en SLs plus complexes dans le Golgi, il peut également être phosphorylé pour donner du céramide 1-phosphate (C1P). L'enzyme qui catalyse cette réaction est une céramide kinase (CK) et appartient à la famille des DAG kinases. Le C1P redonnera à nouveau du céramide après déphosphorylation par une C1P phosphatase (C1PP) localisée dans la membrane plasmique (Boudker and Futerman, 1993). (Pour revue Gault *et al.*, 2010).

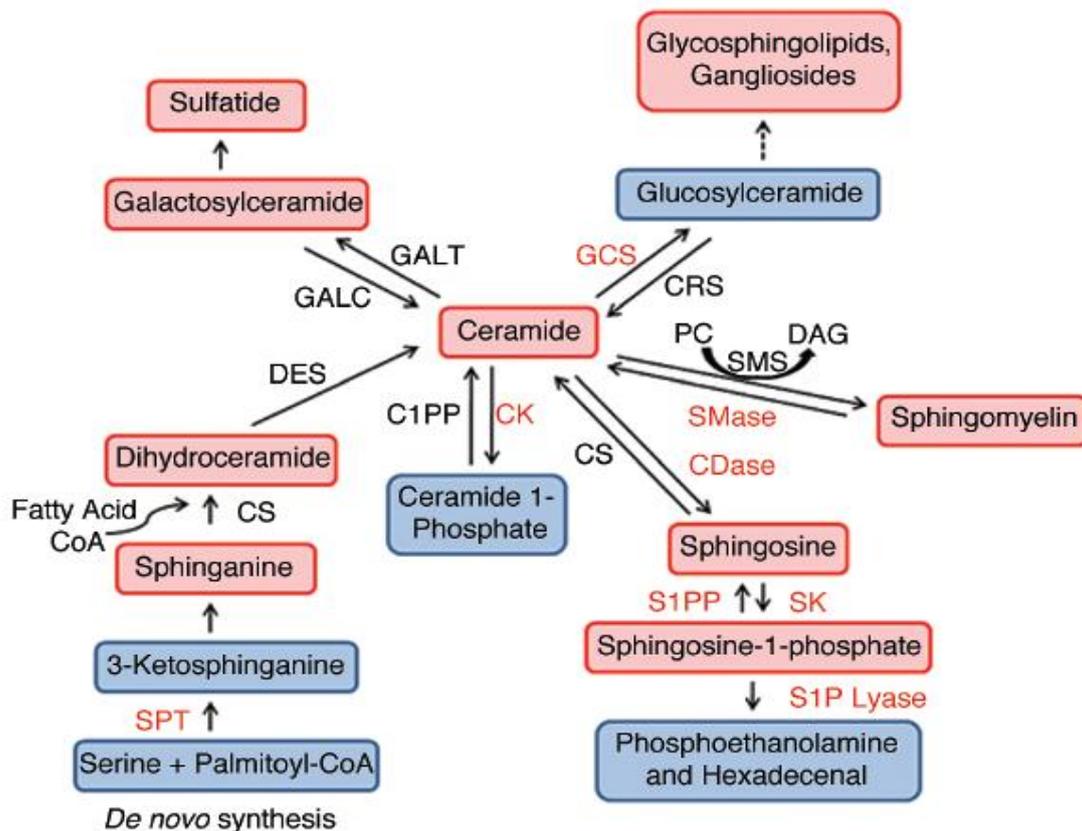


Figure 11 Métabolisme des Sphingolipides (d'après Ryland *et al.*, 2011)

CK : céramide kinase ; C1PP : céramide 1-phosphate phosphatase ; CRS : cérébrosidase ; CS : céramide synthase ; CDase : céramidase ; DAG : diacylglycérol ; DES : dihydrocéramide désaturase ; GALC : galactosylcéramidase ; GALT : galactosyltransférase ; GCS : glucosylcéramide synthase ; PC : phosphatidylcholine ; SK : sphingosine kinase ; S1PP : sphingosine 1-phosphate phosphatase ; S1P Lyase : sphingosine 1-phosphate lyase ; SMS : sphingomyéline synthase ; SMase : sphingomyélinase ; SPT : sérine palmitoyl transférase.

II. LA SPHINGOSINE 1-PHOSPHATE, UN LIPIDE BIOACTIF

II.1 Métabolisme de la sphingosine 1-phosphate (S1P)

La S1P est un dérivé phosphate de la sphingosine considéré comme un médiateur lipidique vital. A l'origine, la S1P était considérée comme un simple intermédiaire de détoxification de la sphingosine. Depuis la découverte de son rôle dans la régulation de la

croissance cellulaire (Zhang *et al.*, 1991) et de ses effets anti-apoptotiques, la S1P a suscité l'intérêt de nombreuses études qui ont mis en évidence son implication dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques qui s'étendent au-delà d'un simple rôle structural. Les taux intracellulaires de ce lipide bioactif sont faibles, variables selon les tissus et finement régulés par trois enzymes : la SK, la S1P Lyase et la S1PP, qui maintiennent un équilibre entre la biosynthèse et la dégradation de la S1P (Figure 12).

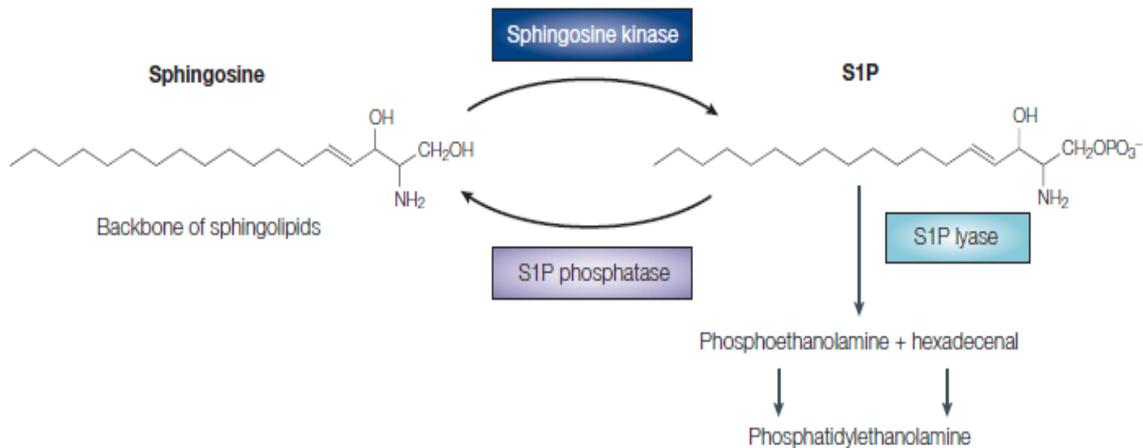


Figure 12 Formation et dégradation de la S1P (d'après Spiegel *et al.*, 2003)

a) Synthèse de la S1P : les sphingosines kinases 1 et 2

Les sphingosine kinases (SK) sont des enzymes capitales dans le métabolisme des sphingolipides, situées au centre d'un carrefour entre S1P, sphingosine et céramide. Elles assurent la biosynthèse de la S1P par ajout d'un groupement phosphate sur la sphingosine. Ces enzymes de la famille des DAG kinases utilisent l'ATP pour phosphoryler le groupement hydroxyl en C1 de la sphingosine, de la dihydrosphingosine ou dans le cas de SK2 de la phytosphingosine également.

- Caractéristiques structurales et fonctionnelles des sphingosine kinases 1 et 2

Isolée la première fois à partir de foie de rat, la SK fut détectée dans les fractions cytosoliques grâce à son activité enzymatique (Hirschberg *et al.*, 1970). Mais ce n'est qu'en 1998 que la première SK de mammifère a été clonée et caractérisée chez la souris. A partir de là, l'isoforme humaine (SK1) a pu être identifiée grâce à une homologie de séquence avec l'enzyme murine (Nava *et al.*, 2000). Une deuxième isoforme de SK humaine et murine, découverte dans la même année, a été clonée par l'équipe de Spiegel : la SK2 (Liu *et al.*, 2000).

Chez les mammifères, les gènes *SphK1* et *SphK2* sont respectivement situés sur les chromosomes 17q25.2 et 19q13.2. D'un point de vue structural, les gènes sont composés de 5 domaines conservés (C1-C5) avec un seul site catalytique localisé entre C1 et C3. Le site de liaison de l'ATP est quant à lui situé au sein du domaine C2. L'analyse du gène *SphK1* n'a pas permis d'identifier de région hydrophobe transmembranaire alors que dans *SphK2* quatre régions ont été retrouvées. Malgré une forte homologie entre *SphK1* et *SphK2* leurs séquences divergent suffisamment pour indiquer qu'elles ne sont probablement pas issues de la duplication d'un simple gène (Figure 13).

Les modèles murins *SphK1*^{-/-} ou *SphK2*^{-/-} sont viables et ne présentent pas de phénotype particulier laissant penser que ces deux enzymes pourraient avoir des fonctions redondantes. Cependant il existe quelques subtilités phénotypiques propres à chaque déficit d'enzyme. En effet les taux plasmatiques de S1P résiduels diffèrent selon le déficit de SK1 ou de SK2. Par contre, le double knockout *SphK1* et *SphK2* entraîne une létalité embryonnaire due à un défaut de développement du système cardiovasculaire (Mizugishi *et al.*, 2005). Bien que SK1 et SK2 soient les deux seules isoformes clonées à l'heure actuelle chez les mammifères, certaines études rapportent l'existence d'au moins trois SKs aux propriétés différentes. Par exemple des essais d'immunodéplétion par des anticorps anti-SK1 et anti-SK2 chez la souris n'ont pas permis d'altérer totalement l'activité enzymatique dans les tissus murins (Fukuda *et al.*, 2003). C'est pourquoi, l'hypothèse de l'existence d'une SK supplémentaire n'est pas à exclure.

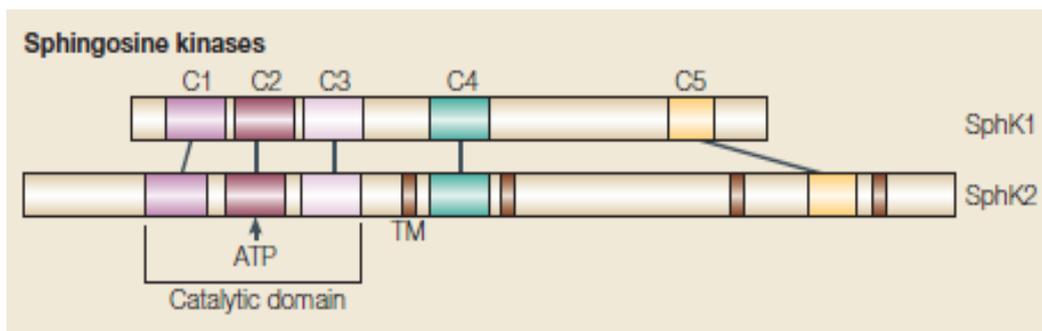


Figure 13 Structure des sphingosine kinases (d'après Spiegel *et al.*, 2003)

- Distribution de SK1 et SK2

Chez les mammifères, malgré une répartition ubiquitaire, les deux SK diffèrent par leur distribution temporelle et spatiale. Alors que la SK1, qui apparaît dès le 7^{ème} jour du développement embryonnaire et s'exprime de préférence dans le cerveau, le cœur, le thymus, la rate, le rein et le poumon, la SK2 apparaît plus tardivement avec un pic au 17^{ème} jour et à

l'âge adulte avec une localisation prépondérante dans le cœur, le rein et le foie (Liu *et al.*, 2000).

Au niveau cellulaire, SK1 est une enzyme cytosolique mais peut aussi être liée à la membrane, transloquer au noyau et éventuellement être sécrétée dans le milieu extracellulaire (Johnson *et al.*, 2002)(Inagaki *et al.*, 2003). SK2 moins étudiée, est localisée de façon prédominante dans le noyau et dans la région périnucléaire des cellules.

- Régulation de l'activité de la SK1

La SK peut être stimulée par de multiples activateurs parmi lesquels :

- des récepteurs : récepteurs couplés aux protéines G, récepteurs tyrosine kinase, récepteurs aux immunoglobulines.
- des cytokines pro-inflammatoires : TNF, IL1 β , TGF β
- des facteurs de croissance : PDGF, VEGF, HGF, EGF, IGF, NGF
- des hormones : œstradiol
- des esters de phorbol : TPA, PMA
- les LDL oxydées, la vitamine D3, le LPS, l'AMPc, l'histamine.

Les mécanismes d'activation de ces différents stimuli ne sont pour l'instant pas complètement élucidés. Plusieurs mécanismes sont proposés pour une activation optimale de l'enzyme ; il s'agirait principalement d'une activation post-transcriptionnelle qui affecterait l'état de phosphorylation de la SK, sa localisation dans la cellule ou son interaction avec d'autres protéines.

Bien que la SK1 soit une enzyme cytosolique, des études ont montré que son activation était accompagnée d'une translocation à la membrane plasmique en réponse à différents stimuli comme le PMA ou le TNF α . Cette translocation n'est possible que si l'enzyme est phosphorylée sur une sérine en position 225 via l'action de ERK. Une fois localisée à la membrane, la SK1 peut phosphoryler son substrat la sphingosine (Pitson *et al.*, 2003). Même si la translocation de SK1 à la membrane plasmique reste le principal mécanisme de régulation de son activité enzymatique, la kinase peut aussi se déplacer vers la région périnucléaire ou dans le noyau grâce à la présence de deux séquences d'export nucléaire nécessaire pour que SK1 quitte le noyau. Cependant, le mécanisme d'entrée dans le noyau n'est pas encore élucidé.

La présence de sites de phosphorylation de PKC sur la séquence de SK1 a permis de découvrir un nouveau mécanisme d'activation de l'enzyme. En réponse à des stimuli comme le PMA ou des conditions d'hypoxie, PKC pourrait activer la kinase en deux phases : une translocation à la membrane suivie d'une stimulation transcriptionnelle ERK-dépendante (Nakade *et al.*, 2003).

D'autres mécanismes d'activation de SK1 ont été proposés. Une activation via la phospholipase D (PLD) entraînant une colocalisation des deux protéines dans la région périnucléaire suivie d'une liaison de la SK1 à l'acide phosphatidique (PA), produit de la PLD. Cette liaison augmenterait l'activité de SK1 *in vitro* (Olivera *et al.*, 1996).

Une régulation par le calcium a été suggérée dans plusieurs études montrant que la dépolarisation de la membrane augmente l'activité de la SK et la production de S1P via l'influx de calcium intracellulaire (Alemany *et al.*, 2001). D'autres équipes ont décrit que sous stimulation par les esters de phorbol, la SK1 est phosphorylée, catalytiquement active mais ne transloque pas à la membrane si le site de liaison au complexe calmoduline/calcium n'est pas fonctionnel (Sutherland *et al.*, 2006).

L'interaction de SK1 avec d'autres protéines semble aussi réguler ses fonctions. Outre sa translocation à la membrane médiée par ERK, l'activation de SK1 par le TNF α requiert une interaction avec la protéine adaptatrice TRAF2 (TNFR-receptor Associated Factor 2) (Xia *et al.*, 2002).

Une régulation transcriptionnelle/traductionnelle a également été décrite. En effet, une équipe a montré que le TGF β était responsable d'une élévation des taux d'ARNm de la SK1, ainsi que de son taux protéique et de son activité dans des fibroblastes dermiques. Ce phénomène était également accompagné d'une augmentation des taux de S1P (Yamanaka *et al.*, 2004). L'augmentation des taux de l'ARNm de SK1 a aussi été illustrée dans de nombreuses tumeurs. Cependant, même si la régulation du transcrit codant pour SK1 semble être un mécanisme important pour la prolifération cellulaire, les protéines impliquées dans ce contrôle transcriptionnel ne sont pas encore identifiées (pour revue Taha *et al.*, 2006).

Malgré un grand nombre d'études qui se sont penchées sur les mécanismes d'activation de la SK1, peu d'explications s'attardent sur son mode d'inhibition. La régulation négative de cette protéine a été décrite comme un mécanisme de protéolyse conduisant à la mort cellulaire programmée. La dégradation de la SK surviendrait après stimulation par des agents tels que le TNF α ou des dommages de l'ADN (Taha *et al.*, 2004).

- Régulation de la SK2

La régulation et les fonctions de SK2 sont moins connues que pour SK1. Toutefois, des études ont montré que SK2 pouvait se lier à la calmoduline au niveau d'un site conservé entre les deux SKs mais contrairement à SK1, cette interaction n'altère pas la localisation cellulaire de SK2 (Sutherland *et al.*, 2006). Peu d'agonistes (EGF, récepteur aux IgE, IL-1 β et TNF α) peuvent activer SK2. Parmi eux, l'EGF peut induire la phosphorylation de SK2 sur les résidus Sérine 351 et Thréonine 578 par un mécanisme dépendant de ERK (Hait *et al.*, 2007). Par ailleurs, le récepteur aux IgE, connu pour activer SK1 dans les mastocytes, peut aussi activer SK2 et induire sa translocation à la membrane (Olivera *et al.*, 2006). Bien que l'expression de SK2 soit associée à un effet antiprolifératif et pro-apoptotique, des études ont montré que SK2 pouvait protéger les cellules MCF7 (cancer du sein) et HCT116 (cancer du colon) de la mort induite par la doxorubicine (Sankala *et al.*, 2007).

b) Dégradation de la S1P : S1P phosphatase et S1P lyase

La dégradation de la S1P fait appel à deux voies. Une dégradation réversible de la S1P assurée par la S1PP qui génère de la sphingosine et une dégradation irréversible catalysée par la S1P Lyase, située dans le RE, pour donner de l'hexadécénal et de la phosphoéthanolamine (Figure 12).

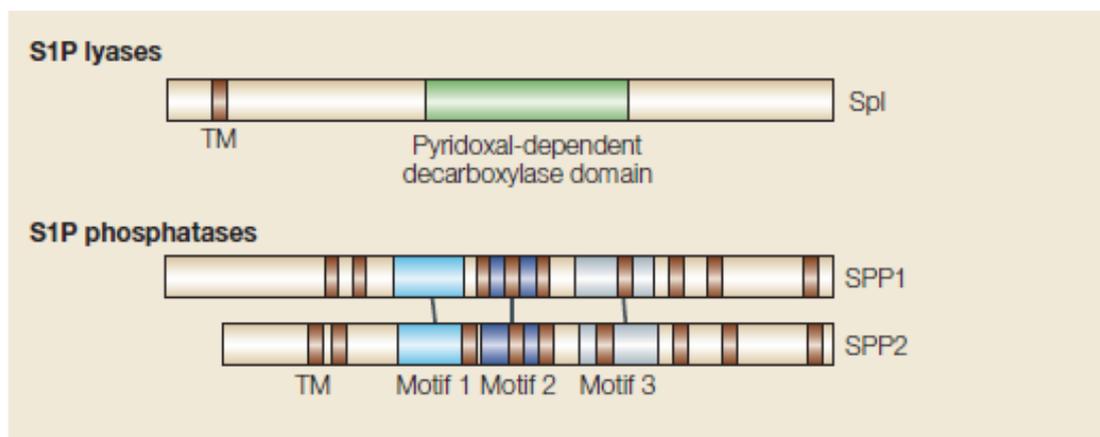


Figure 14 Structures des enzymes de dégradation de la S1P (d'après Spiegel *et al.*, 2003)

b-1) S1P phosphatase

- Caractéristiques structurales et fonctionnelles

La S1P cytosolique peut être déphosphorylée au niveau du RE par des phosphatases spécifiques. La notion d'enzyme spécifique des bases sphingoïdes a été évoquée la première fois dans des travaux de van Veldhoven (van Veldhoven and Mannaerts, 1994). Cette enzyme

a été caractérisée biochimiquement à partir d'extraits de foie de rat avant d'être identifiée et clonée. Chez les mammifères, il existe deux isoformes de S1P phosphatase : la S1PP1 et la S1PP2 qui possèdent 70 % d'homologie. Les gènes qui codent pour les S1PP1 et 2 sont situés sur les chromosomes 14q23.1 et 2q36.3, respectivement. D'un point de vue structural, S1PP1 et S1PP2 contiennent 8 à 10 domaines transmembranaires et présentent une haute spécificité de substrat pour les bases sphingoïdes phosphorylées. Ces deux enzymes possèdent trois motifs conservés que l'on retrouve dans la superfamille des lipide-phosphate phosphohydrolases et qui correspondent au site catalytique (Figure 14). Les deux enzymes possèdent donc une structure et des caractéristiques biochimiques similaires.

- Distribution

En ce qui concerne la répartition tissulaire, S1PP1 et S1PP2 sont exprimées de façon ubiquitaire, avec une expression particulièrement élevée dans le rein et le placenta pour S1PP1, dans le cœur, le rein et le colon pour S1PP2.

Dans la cellule, les deux isoformes sont localisées au niveau du réticulum endoplasmique.

- Régulation

Il a été démontré que la surexpression de l'isoforme S1PP1 au niveau du RE entraînait une accumulation de céramide et de sphingosine, altérant alors la balance dynamique entre S1P et sphingosine/céramide. La conséquence est une augmentation de l'apoptose (Le Stunff *et al.*, 2002). De plus, une forte expression de S1PP1 diminue le relargage extracellulaire de S1P, suggérant que cette enzyme peut réguler négativement les effets extracellulaires de ce lysophospholipide bioactif (Johnson *et al.*, 2003). Récemment, l'équipe de Le Stunff a montré que le recyclage de la sphingosine en céramide, médié par S1PP1, était potentialisé par la surexpression de SK2. Ces deux enzymes agiraient de façon coordonnée par un cycle de phosphorylation-déphosphorylation (Le Stunff *et al.*, 2007).

A ce jour, les effets de l'isoforme S1PP2 sont moins bien connus en ce qui concerne la régulation du métabolisme des SLs. Cette isoforme serait cependant activée durant la réponse inflammatoire (Mechtcheriakova *et al.*, 2006).

b-2) S1P Lyase

- Caractéristiques structurales et fonctionnelles

La S1P Lyase est l'enzyme responsable de la conversion de la S1P en hexadécénal et phosphoéthanolamine, étape finale du catabolisme des SLs. Les substrats de cette dihydrosphingosine 1-phosphate aldolase sont des bases phosphorylées à longue chaîne comme la S1P, mais aussi la dihydroS1P, la phytoS1P et la dihydrosphingosine 1-phosphonate. Le gène codant pour la S1P Lyase, situé sur le chromosome 10q21, a été pour la première fois cloné à partir de *S. cerevisiae* et les homologues murin et humain ont été identifiés par la suite par homologie de séquence. Il code pour une protéine de 63.5 KDa. D'un point de vue structural, la S1P Lyase possède un domaine transmembranaire proche de son extrémité N-terminale ainsi qu'un domaine de liaison du cofacteur le pyridoxal 5'-phosphate (*pyridoxal-dependent decarboxylase conserved*) qui contient des résidus cystéine Cys218 et Cys317 ayant un rôle important pour la fonctionnalité de l'enzyme (van Veldhoven *et al.*, 2000) (Figure 14).

Le rôle la S1P Lyase a été décrit grâce à l'étude du phénotype des souris *Sgpl1*^{-/-}. Les animaux déficients pour cette enzyme présentent une incapacité à prendre du poids, des hémorragies vasculaires, des défauts du squelette et une mort prématurée à l'âge de huit semaines (Schmahl *et al.*, 2007). Ces observations suggèrent que la S1P Lyase est essentielle dans le développement de nombreux tissus chez les mammifères.

- Distribution

La S1P lyase est une protéine ubiquitaire, ayant une distribution tissulaire large mais variable selon la localisation tissulaire. Elle est particulièrement élevée dans le thymus et l'intestin et au contraire faible dans le cerveau et le muscle squelettique, laissant penser que la S1P Lyase serait exprimée dans des tissus soumis à un « turn-over » rapide. Particularité de la S1P Lyase, son expression est inexistante dans les érythrocytes et les plaquettes car ces cellules sont dépourvues de RE. L'expression de cette enzyme est forte dans l'épithélium thymique et très faible dans les lymphocytes créant un gradient de S1P essentiel pour le trafic des lymphocytes du thymus vers la circulation sanguine et les organes lymphoïdes secondaires (Schwab *et al.*, 2005).

Dans la cellule, la S1P Lyase est transmembranaire, localisée exclusivement au niveau du RE. Son site catalytique exposé sur la face cytosolique lui permet d'accéder directement à la S1P synthétisée au sein même de ce compartiment.

- Régulation

La régulation de la S1P Lyase est assez peu connue. Des études ont montré que les facteurs de transcription de la famille GATA pouvaient contrôler la transcription de cette enzyme chez le nématode et chez l'homme (Oskouian *et al.*, 2005). De plus, la régulation transcriptionnelle de la S1P Lyase par le PDGF a été mise en évidence dans des cellules souches embryonnaires murines (Chen *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'analyse de la région 5' non traduite du gène de la S1P Lyase indique que d'autres mécanismes de régulation pourraient être impliqués. Enfin, il existerait une régulation post-traductionnelle par nitrosylation ou par phosphorylation (Zhan and Desiderio, 2006).

Les données de la littérature montrent que la surexpression de la S1P Lyase est liée à une augmentation de l'apoptose et qu'à l'inverse son expression est diminuée dans les tumeurs coliques (Oskouian *et al.*, 2006). Enfin, notre équipe a montré très récemment que les cellules génétiquement invalidées pour la S1P Lyase étaient chimiorésistantes et induisaient des tumeurs après injection chez la souris (Colié *et al.*, 2009).

II.2 Localisation cellulaire et transport de la S1P

a) Sources de S1P et gradient de concentration

Chez l'homme, c'est dans le sang circulant que les concentrations de S1P sont les plus élevées. Dans le plasma où la S1P circule couplée à l'albumine ou aux lipoprotéines, les concentrations sont comprises entre 0.2 à 0.9 μM . Les sources de S1P circulante sont les plaquettes principalement, dépourvues d'activité S1P Lyase, les érythrocytes et les cellules endothéliales (Hänel *et al.*, 2007). Des souris invalidées de façon conditionnelle pour SK1 et SK2 ont montré que la S1P circulante provenait majoritairement des globules rouges évoquant alors la capacité de ces cellules à incorporer la S1P du milieu extracellulaire et de la stocker afin d'éviter sa dégradation. Même si les concentrations plasmatiques de S1P sont élevées, la demi-vie de ce lipide est relativement courte (environ 15 minutes) et des études ont montré que la S1P n'était pas dégradée par les éléments du sang (Venkataraman *et al.*, 2008).

Dans la lymphe, les concentrations de S1P sont réduites de 75 % et elles sont encore plus faibles (0.5 à 0.75 pmol/mg) dans les tissus, ce qui prouve l'existence d'un gradient de concentration de S1P entre le sang et les tissus. De façon intéressante, les concentrations de S1P estimées dans le tissu interstitiel sont de l'ordre du nM ce qui laisse penser que ce gradient est nécessaire au passage des cellules immune et hématopoïétique de la circulation

sanguine à la circulation lymphatique. Le gradient de S1P semble influencé par les propriétés physicochimiques de ce lipide. Par exemple, l'affinité de la S1P pour les HDL, l'albumine ou pour les membranes hydrophobes pourrait contribuer à la diffusion et aux mouvements de la S1P. De plus, les gradients de S1P sont influencés par la distribution et l'activité des enzymes responsables de sa biosynthèse et de son métabolisme.

La présence d'un gradient de S1P *in vivo* pose à ce jour de nombreuses questions. Les sources cellulaires de S1P, la cinétique de synthèse et de dégradation, l'expression et l'activité des enzymes du métabolisme de S1P et la disponibilité du substrat sont autant de problématiques qu'il reste à élucider (pour revue, Hla *et al.*, 2008).

b) Sécrétion/export de S1P et enrichissement dans le plasma

Bien qu'étant synthétisée dans la cellule, la S1P est présente dans le milieu extracellulaire à des taux relativement élevés. Cela sous-entend que soit ce lysophospholipide est généré directement en extracellulaire grâce à des SKs présentes sur le feuillet externe de la membrane plasmique, soit les cellules peuvent sécréter la S1P hors de la cellule.

Des études ont montré qu'il existait une très faible activité enzymatique SK dans le plasma suggérant la présence d'une enzyme soluble dans le plasma (5.3 nmol/g de plasma). A partir de sphingosine résiduelle circulante, la SK sécrétée dans le plasma pourrait générer de la S1P (Venkataraman *et al.*, 2006).

L'export de la S1P du cytosol vers l'environnement extracellulaire n'est pas complètement connu. La S1P étant trop polaire pour traverser spontanément la membrane plasmique hydrophobe, il doit donc exister un mécanisme de transport actif. Des études ont démontré l'existence de transporteurs de type ABC (ATP Binding Cassette) : ABCC1 dans les mastocytes, ABCA1 dans les astrocytes et ABCA7 dans les plaquettes. L'analyse de l'export de S1P chez des souris déficientes pour ABCA1, ABCA7 ou ABCC1 n'a pas montré de réduction des taux plasmatiques du lipide phosphate. Cela suggère que l'absence d'un seul sous-type de transporteur n'est pas une étape limitante dans le relargage de S1P et que des mécanismes compensatoires où interviendraient d'autres transporteurs ABC peuvent exister. Les mécanismes moléculaires qui régissent le passage de la S1P à travers le transporteur ne sont, à l'heure actuelle, pas connus.

II.3 Cibles et mode d'action de la S1P

La S1P a un rôle crucial dans de nombreuses fonctions cellulaires selon deux modes d'action bien distincts. Elle peut agir via sa fixation sur des récepteurs présents à la surface cellulaire ou directement en tant que second messager dans la cellule.

a) Action extracellulaire : les récepteurs de la S1P

Lorsqu'elle est sécrétée, la S1P peut devenir le ligand de 5 récepteurs spécifiques S1PRs (S1P1 à S1P5), en agissant de façon autocrine ou paracrine. Ce sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G appartenant à la famille des récepteurs EDG (Endothelial Differentiation Gene). Leur expression est spécifique d'un type cellulaire et de la protéine G à laquelle ils sont couplés ; c'est pourquoi ces récepteurs sont capables d'induire une grande variété de signaux après leur activation (pour revue, Strub *et al.*, 2010).

Sous l'effet de stimuli tels que les hormones, les facteurs de croissance ou les cytokines, les SKs activées génèrent de la S1P dans la cellule qui peut être sécrétée dans le milieu extracellulaire pour se lier aux S1PRs. On parle alors de boucle de signalisation par un phénomène d'« inside-out ». La transactivation des S1PRs est influencée par la sécrétion de S1P mais aussi par les taux intracellulaires de S1P. En effet, la diminution des taux de S1P dans la cellule après surexpression de S1PP1 entraînerait une inhibition de la transactivation (Le Stunff *et al.*, 2004) ; A l'inverse l'accumulation de S1P après inhibition de la S1P Lyase serait favorable à la transactivation des S1PRs (Schwab *et al.*, 2005).

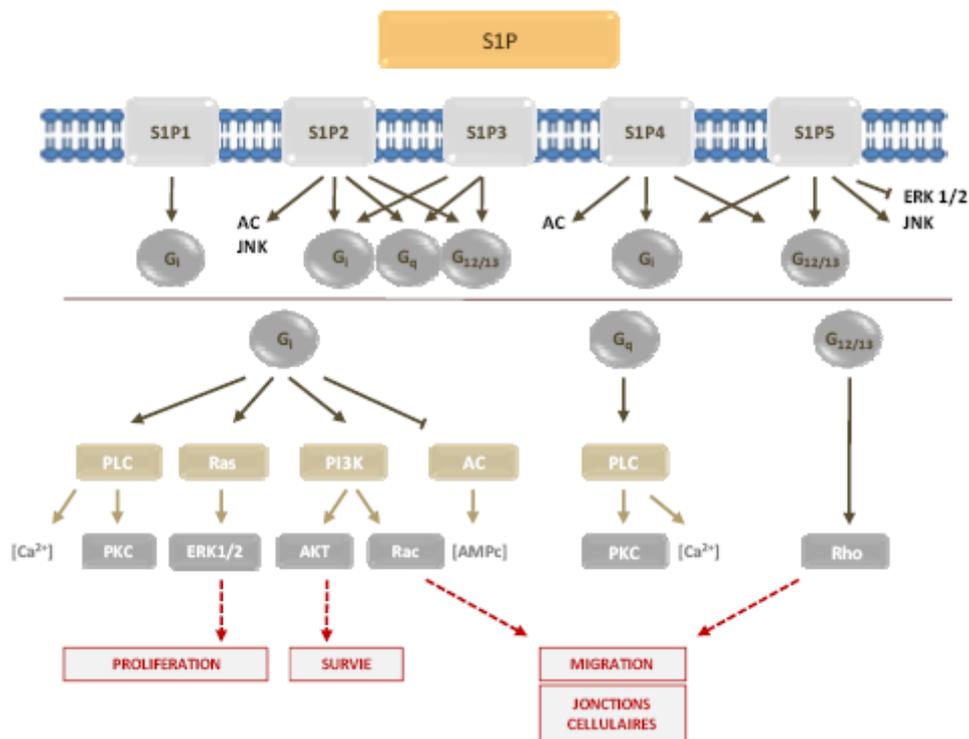


Figure 15 : **Modes d'action extracellulaire de la S1P** (D'après Dayon A, 2008. Manuscrit de thèse « rôle de la sphingosine kinase-1 dans la survie et la progression des cellules tumorales prostatiques LNCaP vers l'androgéno-indépendance »).

- S1P1

S1P1 est exprimé de façon ubiquitaire malgré des taux plus élevés dans le cerveau, le poumon, la rate, le système cardiovasculaire et le rein. Son rôle majeur dans l'angiogenèse a été démontré chez des souris déficientes pour ce récepteur chez qui l'absence de S1P1 a conduit à la mort embryonnaire par hémorragies dues à un système vasculaire immature (Liu *et al.*, 2000). Il a été montré que le knockout conditionnel de S1P1 dans les cellules endothéliales murines conduisait aux mêmes troubles vasculaires. Le rôle de S1P1 dans le maintien de l'intégrité vasculaire est médié par des effecteurs moléculaires tels que AKT et Rac.

S1P1 semble aussi impliqué dans l'immunité puisque son expression est nécessaire à la sortie ganglionnaire des lymphocytes. Dans les cellules B et T, la régulation négative ou la délétion de S1P1 se traduit par une lymphopénie par incapacité des lymphocytes à sortir des ganglions (Matloubian *et al.*, 2004). De plus, la transplantation de thymocytes et lymphocytes déficients pour S1P1 à des souris normales conduit à leur séquestration dans les ganglions et les plaques de Peyer (Chi *et al.*, 2005).

- S1P2

S1P2 est largement distribué dans de nombreux types cellulaires. Mais contrairement aux souris KO pour S1P1, les souris déficientes pour S1P2 ne présentent pas à la naissance d'anomalie particulière hormis des signes d'hyperexcitabilité pyramidale et une surdité, démontrant le rôle de ce récepteur dans le développement du système auditif. Impliqué dans de nombreux processus physiologiques, il a été démontré que S1P2 était nécessaire à la dégranulation des mastocytes, facilitait la perméabilité vasculaire via l'activation de ROCK/Rho (Sanchez *et al.*, 2007) et favorisait le remodelage du tissu hépatique après une lésion. Enfin, il semblerait que l'activation de S1P2 inhibe la migration cellulaire, s'opposant alors aux effets de S1P1 et S1P3, tous deux associés à une augmentation de la migration des cellules (Lepley *et al.*, 2005).

- S1P3

S1P3 est un récepteur particulièrement exprimé au niveau du système cardiovasculaire, des poumons, des reins, de l'intestin, de la rate et des cartilages. Tout comme pour S1P2, la délétion de S1P3 chez la souris n'entraîne pas de phénotype caractéristique. Par contre, le double knockout S1P2 et S1P3 augmente le risque de mortalité périnatale. Enfin il a été montré que le triple déficit S1P1-3 était associé à une létalité embryonnaire par anomalies vasculaires majeures (Kono *et al.*, 2004).

S1P3 est aussi un régulateur important de la perméabilité vasculaire via l'activation d'effecteurs tels que ROCK et Rho. Enfin, S1P3 étant fortement exprimé dans les myocytes et les cellules musculaires lisses périvasculaires, des études ont montré que son activation entraînait une bradycardie et une hypertension (Forrest *et al.*, 2004).

- S1P4

L'expression de S1P4 est limitée aux tissus lymphoïdes : le thymus, la rate, la moelle osseuse, l'appendice et les leucocytes périphériques. D'un point de vue fonctionnel, S1P4 est couplé aux sous-unités $G\alpha_i$ et $G\alpha_{12/13}$ et son activation stimule les MAPKs, active la phospholipase C et module l'ouverture des canaux calciques suggérant un rôle de ce récepteur dans le réarrangement du cytosquelette et la motilité cellulaire.

- S1P5

Malgré une forte expression de S1P5 dans les oligodendrocytes, la délétion de ce récepteur n'altère pas la myélinisation et ne modifie pas le phénotype de ce type cellulaire (Jaillard *et al.*, 2005). De plus, la liaison de la S1P à S1P5 conduit à une diminution de la

prolifération via une inhibition de la signalisation de ERK. Récemment une étude a démontré que l'absence de S1P5 chez la souris conduisait à des anomalies du trafic et de la mobilisation des cellules NK (Natural Killer) au niveau des zones inflammatoires (Walzer *et al.*, 2007).

Malgré l'importance physiologique des S1PRs, certaines fonctions de S1P sont indépendantes de ces récepteurs.

b) Action intracellulaire

Plusieurs observations sont en faveur d'un rôle de la S1P intracellulaire indépendamment des S1PRs. Rappelons que dans la cellule, elle occupe une place centrale dans le métabolisme des SLs puisque sa dégradation en hexadécénal et phosphoéthanolamine constitue la principale voie de dégradation des bases sphingoïdes. De plus son implication dans de nombreux processus physiologiques comme la régulation de l'homéostasie calcique, la croissance cellulaire, la prolifération et l'inhibition de l'apoptose évoquent pour la S1P un rôle de second messager intracellulaire. Nous allons passer en revue les différents arguments qui étayent ces hypothèses.

Dans les cellules de mammifères, l'expression de SK1 entraîne une diminution des taux de céramide qu'on attribue à un effet inhibiteur direct de la S1P sur la céramide synthase 2 (CerS2) (Laviad *et al.*, 2008). Une analyse de la séquence de la (CerS2) révèle en effet la présence de 2 domaines présentant une homologie avec les S1PRs. Ces observations suggèrent pour la S1P un rôle d'antagoniste de la CerS2 mais cette hypothèse reste à valider.

La transactivation des S1PRs est typiquement accompagnée de la translocation de SK1 à la membrane plasmique mais également dans d'autres compartiments comme le RE. Il a été proposé que la production locale de S1P dans le RE puisse activer directement des canaux calciques avec relargage de calcium intracellulaire (Ghosh *et al.*, 1994). Précédemment décrit chez la levure, ce mécanisme de relargage de calcium illustre le rôle de la S1P en tant que second messager activateur de canaux calciques.

D'autres effets de la S1P ne peuvent être expliqués par l'activation des S1PRs. Par exemple, la surexpression de SK1 favorise la survie de cellules endothéliales via l'activation d'AKT mais cet effet n'est pas reproduit par l'ajout de S1P exogène (Limaye *et al.* 2005). De même, la dihydro-S1P ne produit pas les mêmes effets que la S1P alors que ces deux lipides ont des affinités similaires pour les S1PRs. Enfin, des études ont montré que dans un modèle de tumeur intestinale chez des souris déficientes pour la SK1 ou pour certains S1PRs, seules

les souris invalidées pour la kinase montraient une régression tumorale, soulignant l'importance de l'action intracellulaire de la S1P (Kohno *et al.*, 2006).

Une étude très récente a découvert qu'en plus de son interaction avec la SK1, TRAF2 pouvait se lier directement à la S1P. Cette liaison qui s'effectue au niveau d'un domaine RING situé dans la partie N-terminale de la protéine adaptatrice, stimule l'activité ligase E3 de TRAF2 en réponse à la stimulation par le TNF α (Alvarez *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent l'importance de SK1/S1P dans la signalisation du TNF α et dans l'activation de NF κ B impliqué dans les réponses inflammatoire, anti-apoptotique et immunitaire.

Lorsque la S1P est produite dans le noyau par l'isoforme SK2, elle est capable de réguler l'acétylation des histones en se liant spécifiquement aux histones déacétylases HDAC1 et HDAC2 et en inhibant leur activité enzymatique. Ces travaux soulignent l'importance de la S1P dans la régulation épigénétique via une interaction directe avec les HDACs (Hait *et al.*, 2009).

Enfin il existerait un lien entre S1P intracellulaire et réponse inflammatoire. Prenons l'exemple de cellules T CD4⁺ issues de souris *SphK2*^{-/-} qui après traitement par l'interleukine 2, ont montré un phénotype d'hyperactivation (prolifération et sécrétion de cytokines accrues), effet qui n'a pas été reversé par l'ajout de S1P exogène. Cela suggère que la S1P interne est capable de supprimer la réponse inflammatoire induite par l'interleukine 2 (Samy *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces données confirme que la S1P intracellulaire exerce des effets qui semblent dépendants du site de production de ce lipide bioactif et fortement liés au cancer et à d'autres pathologies inflammatoires. Cependant les cibles directes de la S1P ne sont pas clairement identifiées à ce jour.

II.4 La S1P, un lipide aux nombreuses fonctions biologiques

a) Rôle dans le système vasculaire et l'angiogenèse

La S1P, retrouvée à des concentrations importantes dans le sérum, est capable de se fixer aux récepteurs EDG exprimés par les cellules endothéliales. La S1P est un puissant inducteur de la survie des cellules endothéliales puisque l'activation des S1PRs par la S1P conduit à l'activation de l'activité NO synthase (NOS), permettant la production de l'oxyde nitrique, second messenger impliqué dans la relaxation des tissus vasculaires (Lee *et al.* 1999). A l'opposé, la S1P exerce un effet vasoconstricteur au niveau des coronaires ou des artères rénales (Coussin *et al.*, 2002), sans doute expliqué par les différences de distribution tissulaire

et de signalisation des récepteurs EDG. La S1P est également impliquée dans la stabilisation des vaisseaux comme le suggère l'obtention du knockout pour S1P1 dont la létalité au stade embryonnaire est attribuée à des malformations vasculaires responsables d'hémorragies (Liu *et al.*, 2000).

Lorsqu'un vaisseau est agressé, un processus d'angiogenèse se met en place pour régénérer le tissu lésé. L'étape d'agrégation plaquettaire conduit au relargage de nombreux facteurs de croissance tels que le VEGF, le PDGF mais également la S1P. Outre son puissant effet inducteur du chimiotactisme et de la migration des cellules endothéliales, la S1P peut aussi réguler leur différenciation morphogénique ainsi que leur prolifération (Kimura *et al.*, 2000). De plus, il a également été mis en évidence que la S1P pouvait entraîner la transactivation du récepteur au VEGF (Tanimoto *et al.*, 2002) et qu'à son tour le VEGF peut induire l'expression des récepteurs EDG1, potentialiser les effets de la S1P sur les cellules endothéliales (Igarashi *et al.*, 2003) et activer la SK1 dans des cellules tumorales de vessie (Wu *et al.*, 2003).

Les effets angiogéniques de la voie SK1/S1P pourraient passer par l'activation de la signalisation PI3K/AKT, la voie eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*) ou bien encore l'activation de RAS et des MAPKs.

b) Rôle dans l'immunité et l'inflammation

Les récepteurs de la S1P sont exprimés par de multiples cellules du système immunitaire au cours des différents stades de différenciation. Le rôle immunorégulateur de la S1P a été mis en évidence lors d'études sur la molécule immunosuppressive : le FTY720. Ce composé, un analogue de la sphingosine, a été au départ identifié comme une drogue immunomodulatrice indiquée dans le rejet de greffe après transplantation. Après avoir été efficacement phosphorylé en FTY720-phosphate, ce dernier se fixe sur les récepteurs S1PRs comme agoniste, induisant alors une lymphopénie importante et réversible chez l'homme (Brinkmann *et al.*, 2002). Il apparaît que l'étape de phosphorylation est essentielle à l'effet immunosuppresseur et la SK2 serait capable de phosphoryler le composé (Sanchez *et al.*, 2003). Le knockout conditionnel du S1P1 dans les lymphocytes T se traduit par une incapacité des cellules T à circuler dans les vaisseaux lymphatiques d'où leur accumulation dans les organes (Allende *et al.*, 2004). Cette étude suggère que ce récepteur permet la circulation des lymphocytes T en dehors des nœuds lymphatiques.

Enfin, l'équipe de Schmahl a montré chez des souris déficientes pour la S1P Lyase après un traitement par le colorant alimentaire, le 2-acétyl-4-tétrahydroxybutylimidazole (THI), l'apparition d'une lymphopénie par altération du gradient de S1P, ce qui prouve l'importance de ce lysophospholipide dans l'immunité (Schmahl *et al.*, 2007).

c) Rôle dans le système nerveux central (SNC)

Les récepteurs de la S1P sont abondamment exprimés dans le système nerveux central et périphérique tout particulièrement S1P1 retrouvé en grande quantité dans la matière blanche, l'hippocampe et le cervelet mais également S1P3 et S1P5. Dans les années 1990, une étude s'intéressant au rôle de la S1P dans le système nerveux a démontré que ce lipide bioactif pouvait induire la rétractation des cellules neuronales via le récepteur S1P2 et l'activation de la voie Rho (Postma *et al.*, 1996). En étudiant l'expression des récepteurs EDG dans les cellules gliales du système nerveux périphérique telles que les cellules de Schwann, les travaux de Weiner ont montré que la S1P et le LPA pouvaient inhiber l'apoptose de ces types cellulaires selon un mécanisme impliquant les récepteurs et la voie PI3K/AKT (Weiner *et al.*, 2001).

Aujourd'hui cependant, de nombreux aspects cellulaires de la biologie de la S1P dans le système nerveux restent à élucider tels que les mécanismes de transport et de sécrétion de la S1P ou bien encore la connaissance de la potentielle localisation post- ou pré-synaptique de l'expression des récepteurs.

d) Rôle dans le développement et le système squelettique

Les souris déficientes pour S1P1 (Liu *et al.*, 2000) présentent un défaut de développement des membres. Chez les embryons des souris knockout, on remarque des anomalies de formation du cartilage et des doigts, une hypervascularisation au niveau des membres et une augmentation du VEGF et du facteur d'adaptation à l'hypoxie HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor). Les travaux de Hla suggèrent que l'absence de stabilité des vaisseaux chez ces animaux réduit le flux sanguin dans les bourgeons des membres, induisant alors une hypoxie des tissus, une augmentation de l'expression du VEGF et par conséquent l'angiogenèse. Ces événements altèreraient considérablement le modelage des bourgeons des membres et seraient responsables des anomalies de leur développement (Hla, 2004).

Plusieurs types de récepteurs EDG sont retrouvés dans les cellules mésenchymateuses du cartilage ainsi que les ostéoblastes matures. Dans ces types cellulaires, la S1P serait capable d'exercer un effet mitogénique (Grey *et al.*, 2004).

e) Rôle dans le système reproducteur

Les récepteurs S1PRs sont exprimés par certaines cellules des testicules ou des ovaires. Même si le rôle de la signalisation SK1/S1P n'est pas clairement établi, il apparaît que l'injection de S1P préviendrait la mort des cellules germinales mâles soumises à une irradiation (Ojala *et al.*, 2004) et chez la femelle, la S1P inhiberait l'apoptose des oocytes lors d'un traitement par chimiothérapie (Tilly and Kolesnick, 2002). La S1P jouerait ainsi le rôle de facteur de survie des cellules germinales mâles et femelles.

III. SPHINGOSINE 1-PHOSPHATE ET CANCER

III.1 Dérégulation du métabolisme de la S1P dans le cancer et thérapies associées

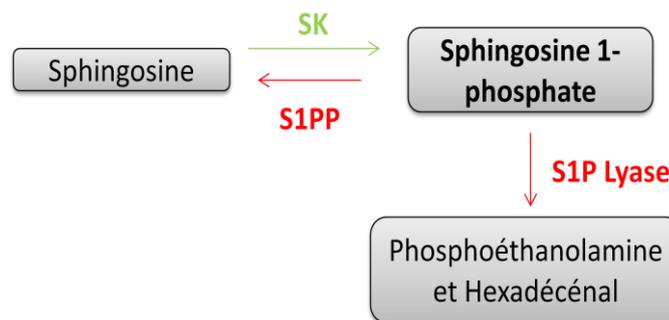


Figure 16 Métabolisme de la sphingosine 1-phosphate

La S1P serait impliquée au niveau de plusieurs étapes du cancer : la prolifération et la transformation cellulaire, l'inflammation et l'angiogenèse et la résistance aux traitements tumoraux.

a) Les enzymes

L'enzyme responsable de la conversion de la sphingosine en S1P existe sous deux isoformes aux propriétés, localisations subcellulaires et fonctions différentes (Figure 16).

- La SK1

La SK1 est liée à la prolifération cellulaire et son expression est augmentée dans de multiples cancers humains lui conférant un potentiel oncogénique. La démonstration de ce caractère oncogénique a été mise en évidence par les travaux de Xia *et al.* Dans cette étude, il

a été décrit que la surexpression de la SK1 dans des fibroblastes NIH-3T3 entraînait la transformation de ces cellules et la capacité à former des tumeurs lorsqu'elles étaient greffées à des souris SCID (severe combined immunodeficiency) (Xia *et al.*, 2000). L'ARN messager de la SK1 est par ailleurs, significativement plus élevé dans les tissus tumoraux comparés aux tissus sains correspondants. Ceci a été rapporté notamment pour : le sein, le côlon, les poumons, les ovaires, l'estomac, l'utérus, le rein, le rectum, et le petit intestin (French *et al.*, 2003)(Johnson *et al.*, 2005). Ainsi, dans le cancer du sein l'expression de l'ARNm de la SK1 est 4 fois plus importante dans les tumeurs que dans l'épithélium sain. Cette augmentation a également été retrouvée dans un modèle de carcinogenèse du côlon (Kawamori *et al.*, 2006) ainsi que dans un modèle de leucémie chez la souris (Le Scolan *et al.*, 2005). De plus, il a été mis en évidence que la surexpression de l'ARNm de la SK1 corrélait avec un mauvais pronostic comme le révèle une étude qui montre que chez des patients atteints d'un glioblastome multiforme, l'augmentation de la SK1 est associée avec une diminution de la survie (102 jours vs 357 pour les patients dont les tumeurs ont une faible expression de la SK1)(Van Brocklyn *et al.*, 2005). Enfin, des travaux montrent qu'une forte activité SK1 est associée à un mauvais pronostic chez les patientes atteintes d'un cancer du sein (Ruckhaberle, *et al.*, 2007).

La SK1 est une cible de choix pour la thérapie anticancéreuse et de nombreux inhibiteurs ont été développés démontrant une activité antitumorale *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, l'inhibition de la SK1 par RNA interférence dans des cellules leucémiques HL-60 a conduit à l'apoptose de ces cellules après un traitement par la doxorubicine ou par l'étoposide (Bonhoure *et al.*, 2006). En outre, l'inhibition de SK1 par le BML-258 a permis de réduire la croissance tumorale de cellules de leucémie aiguë myéloïde dans un modèle de xénogreffe. Enfin, des essais réalisés avec la diméthylsphingosine (inhibiteur non sélectif de SK1) ont conduit à la diminution des taux de S1P dans des modèles de tumeurs coliques et de leucémies, créant alors un environnement cytotoxique pour les cellules cancéreuses. De la même manière, une réduction de la taille d'une tumeur mammaire a été observée chez la souris après un traitement avec la dihydroxyaurone via l'inhibition de la SK1 (French *et al.*, 2003). D'autres composés, les SKI I à V, plus spécifiques des SKs, ont par la suite été développés. Par exemple, il a été montré que le SKI V (2-(3,4- dihydroxy-benzylidene)-benzofuran-3-one) réduisait significativement la croissance de xénogreffes tumorales chez la souris. Toutefois, bien que tous les inhibiteurs de SK sans exception empêchent la formation de S1P, ils entraînent également une accumulation de la sphingosine. Il est donc difficile de

déterminer si l'effet observé lors de l'inhibition de la SK est lié au déficit en S1P ou à l'accumulation de sphingosine (Vadas *et al.*, 2008).

- La SK2

En ce qui concerne l'isoforme SK2, principalement située dans le noyau, elle produit de la S1P impliquée dans la régulation de l'expression génique via l'histone H3 (Hait *et al.*, 2009). Mais de faibles quantités de SK2 pourraient aussi être présentes dans le RE où l'enzyme contribuerait à l'activation de voies pro-apoptotiques (Maceyka *et al.*, 2005). De plus, l'expression de SK2 dans de multiples types cellulaires conduirait à l'inhibition de la synthèse d'ADN et l'arrêt du cycle cellulaire. Cependant des travaux ont rapporté qu'un traitement par un inhibiteur spécifique de SK2 sur des cellules de cancer de la prostate ou d'adénocarcinome du sein était suivi de la mort de ces cellules par autophagie (Beljanski *et al.*, 2010)(Antoon *et al.*, 2010). Les mécanismes moléculaires mis en jeu par cette inhibition ne sont actuellement pas connus.

- S1P lyase et S1P phosphatases

Le catabolisme de la S1P est également altéré dans le cancer en faveur d'une inhibition de la dégradation du lysophospholipide. Rappelons que la S1P peut être dégradée soit en sphingosine pro-apoptotique par une S1PP, soit en phosphoéthanolamine et hexadécénal par une S1P Lyase. Des travaux ont montré que la S1P lyase était régulée négativement dans des tumeurs coliques (Oskouian *et al.*, 2006). Par ailleurs, notre équipe a démontré que des cellules invalidées génétiquement pour la S1P Lyase étaient chimiorésistantes et induisaient des tumeurs après injection chez la souris (Colié *et al.*, 2009). De manière similaire, il semblerait que l'expression de la S1PP soit aussi diminuée dans des cellules de cancer du colon. Par conséquent l'élévation des taux de S1P par à la fois une synthèse accrue et un catabolisme diminué concourt au processus d'oncogenèse (Oskouian *et al.*, 2010).

b) Le lipide phosphate : la S1P

- *Altération des taux de S1P et des S1PRs*

Le rôle de la S1P dans la régulation de la survie, de la prolifération et de la migration des cellules cancéreuses est un sujet largement étudié. De même qu'il est aujourd'hui admis que de fortes concentrations de S1P sont étroitement liées à la résistance à l'apoptose et en conséquence à un sombre pronostic (pour revue, Leong and Saba, 2010). Par ailleurs, il a été prouvé que le ratio cellulaire céramide/S1P était un bon outil prédictif de la réponse des cellules tumorales à la chimiothérapie. En effet, lorsque les taux de S1P sont réduits, des cellules de cancer du pancréas redeviennent sensibles à la gemcitabine (Guillermet-Guibert *et al.*, 2009) alors qu'à l'inverse l'ajout de S1P exogène protège des cellules ovariennes de l'apoptose induite par des traitements anticancéreux (Tilly *et al.*, 2002).

En plus de l'élévation des taux de S1P, des études récentes se sont penchées sur la dérégulation des récepteurs EDG dans le cancer. En effet, S1P1 serait très fortement exprimé à la surface de cellules de lymphome. De même, il existerait une forte expression de S1P1 et S1P3 dans le cytoplasme de cellules tumorales prostatiques (Akao *et al.*, 2006). La surexpression de S1P1 et S1P3 a également été décrite dans un modèle de cancer du sein résistant au tamoxifène (Watson *et al.*, 2010). D'autres travaux sur le cancer du sein ont montré que S1P4 pouvait réguler la voie de ERK via le récepteur HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) (Long *et al.*, 2010).

- *Rôle dans la prolifération, la transformation et la survie cellulaire*

L'implication de SK1 dans la tumorigenèse a été plusieurs fois documentée. Par exemple, une étude a montré que l'injection orthotopique de cellules d'adénocarcinome mammaire MCF-7 surexprimant la SK1 à des souris nues se traduit par la formation de tumeurs beaucoup plus importantes et plus vascularisées que lors de l'injection de cellules contrôles (Nava *et al.*, 2002). A l'inverse, il a été mis en évidence que le blocage de l'expression de la SK1 par siRNA entraînait une diminution de la prolifération cellulaire ou une induction de l'apoptose dans différents modèles de leucémie, de cancer du sein (Taha *et al.*, 2004), de glioblastome (Van Brocklyn *et al.*, 2005), ou bien encore d'adénocarcinome prostatique (Pchejetski *et al.*, 2005).

La S1P ajoutée de manière exogène peut également inhiber efficacement l'apoptose induite par le céramide ou le TNF α en inhibant les caspases et en stimulant la PKC et la SK1 dans les cellules leucémiques (Cuvillier *et al.*, 1996). Les effets protecteurs de la S1P ont également été observés lors du traitement des cellules cancéreuses prostatiques par les

radiations ionisantes. Dans ce modèle, l'ajout de S1P exogène ou à l'inverse l'utilisation d'inhibiteurs de SK1 s'accompagne d'une inhibition des voies apoptotiques (Nava *et al.*, 2000).

Outre ses effets prolifératifs, la S1P pourrait également induire, à fortes concentrations, une différenciation cellulaire comme cela a été observé dans les kératinocytes. Ces effets seraient médiés par la fixation de la S1P au S1P2 (Schuppel *et al.*, 2008).

○ *Rôle dans la migration, l'invasion et la dissémination*

Les récepteurs de la S1P régulent différenciellement la migration cellulaire avec les récepteurs S1P1 et S1P3 qui favorisent ce processus alors que le récepteur S1P2 inhibe le phénomène migratoire (Anliker *et al.*, 2004)(Ishii *et al.*, 2004). Les SKs et la S1P ne régulent donc pas uniquement la croissance des cellules tumorales mais aussi la migration de celles-ci et donc le développement de métastases. La mobilité et l'invasion des cellules tumorales pourraient donc être inhibées ou stimulées par la S1P selon le type de S1PR exprimé par les cellules. Ainsi, il a été montré que la S1P stimulerait la migration des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB- 453 (Döll *et al.*, 2005)(Hait *et al.*, 2005) alors qu'elle inhiberait celle de cellules de mélanome B16 exprimant le récepteur S1P2 (Arikawa *et al.*, 2003).

○ *Rôle dans l'angiogenèse*

Pour ne pas être éliminée par le système immunitaire et pour favoriser son développement, la tumeur doit être capable de perturber les processus d'angiogenèse et d'induire un processus inflammatoire. Comme déjà mentionné, la SK1, la S1P et les S1PRs sont des éléments importants participant au processus physiologique de la vasculogenèse. Il semble important d'évaluer leur implication dans les processus pathologiques d'angiogenèse tumorale et d'inflammation. Différentes stratégies ont été utilisées pour apprécier la place de la signalisation SK1/S1P :

- l'inhibition des récepteurs S1P1 par stratégie siRNA ou par l'utilisation du FTY720 sous sa forme phosphorylée en tant qu'antagoniste des récepteurs EDG ;
- l'utilisation d'un anticorps spécifiquement dirigé contre la S1P.

L'injection de siRNA dirigés spécifiquement contre S1P1 au sein des tumeurs développées chez la souris, conduit à une inhibition de l'expression du récepteur au niveau

des vaisseaux et à l'inhibition de la néoangiogenèse tumorale (Chae *et al.*, 2004). Ce résultat indique que S1P1 est un composant critique de la réponse angiogénique tumorale.

L'utilisation du FTY720 a montré que ce composé inhibiteur est capable de bloquer l'angiogenèse induite par le VEGF et la S1P *in vitro* et *in vivo*. Dans un modèle de mélanome murin, il inhibe la prolifération cellulaire et induit l'apoptose (LaMontagne *et al.*, 2006). Des résultats similaires ont été obtenus dans un modèle *in vivo* de tumeurs pulmonaires LLC1 implantées en sous-cutané (Schmid *et al.*, 2007).

Par ailleurs, Visentin *et al.* ont mis en évidence le rôle de la S1P dans l'angiogenèse et la croissance tumorale en utilisant un anticorps anti-S1P. Ces travaux montrent pour la première fois chez l'animal que l'utilisation d'un anticorps anti-S1P inhibe significativement la formation de vaisseaux (82%) autour de la tumeur. Le traitement avec cet anticorps réduit significativement le développement des tumeurs implantées sous la peau et inhibe l'angiogenèse tumorale (Visentin *et al.* 2006).

○ *S1P et hypoxie*

La prolifération rapide des cellules au cours de la croissance tumorale conduit à la formation de régions hypoxiques, pauvres en oxygène, caractérisées par des cellules qui expriment un taux élevé de HIF-1 α et HIF-2 α , deux facteurs de transcription qui jouent un rôle crucial dans la progression tumorale et plus particulièrement dans l'angiogenèse en régulant l'expression de gènes impliqués dans ce phénomène. Or, il a été décrit que dans des conditions d'hypoxie aigüe ou chronique, les cellules musculaires lisses de poumon expriment fortement la SK1 (Ahmad *et al.*, 2006). De même, les cellules de gliome U87MG, une hypoxie chimique induirait une augmentation de la transcription, de l'activité enzymatique de la SK1 ainsi que de la production de S1P (Anelli *et al.*, 2008). En effet, la région promotrice de SK1 contiendrait des séquences HRE (hypoxia responsive element) nécessaires à la fixation de HIF-1 (Schwalm *et al.*, 2008).

Ces résultats suggèrent que l'hypoxie tumorale pourrait réguler positivement la SK1 au niveau transcriptionnel par l'intermédiaire du facteur HIF. La production de S1P qui résulte de l'augmentation de l'activité SK1 conduirait à l'induction de l'angiogenèse favorisant la progression tumorale.

c) Les thérapies visant la S1P

Etant donné l'impact de ce lysophospholipide sur de nombreux processus biologiques fondamentaux, la S1P est incontestablement au centre de la recherche de thérapies anticancéreuses.

Une des stratégies pour inhiber la voie de signalisation de la S1P consiste à moduler les récepteurs de type EDG. L'agoniste **FTY720** (Fingolimod) connu pour son action immunomodulatrice (cf II.4.b), présente des similarités structurales avec la sphingosine et se lie sous sa forme phosphorylée à quatre des cinq S1PRs : S1P1, S1P3, S1P4 et S1P5. Sa liaison au récepteur induit l'internalisation et la dégradation de S1P1 et se traduit par la régulation négative prolongée du récepteur. Des études menées chez la souris ont montré que l'administration de FTY720 prévenait la croissance de tumeurs hépatocellulaires (Lee *et al.*, 2005) et inhibait la croissance de tumeurs pulmonaires et du sein induites par un carcinogène (Salinas *et al.*, 2009)(Azuma *et al.*, 2003). De plus, le FTY720 peut inhiber l'angiogenèse et la vascularisation tumorale, comme cela a été cité précédemment dans l'exposé (cf II. 4.a) (LaMontagne *et al.*, 2006).

Un autre agent non sélectif, le **VPC23019**, capable d'antagoniser S1P1 et S1P3, bloque la migration de cellules tumorales induite par la S1P dans des modèles de tumeurs thyroïdiennes et ovariennes (Balthasar *et al.*, 2006)(Park *et al.*, 2007).

Outre les cellules tumorales elles-mêmes, d'autres sources de S1P existent, telles que le plasma ainsi que les cellules stromales et inflammatoires rattachées à la tumeur. La neutralisation de la S1P sécrétée permettrait ainsi d'inhiber à la fois les signaux transmis à la cellule par elle-même (par voie autocrine ou « inside-out signaling ») et par son environnement. La neutralisation de la S1P *via un anticorps bloquant* spécifique entraîne une diminution de la progression tumorale et ces effets antitumoraux sont généralisables à différents types de cellules cancéreuses. La capacité de l'anticorps anti-S1P à atténuer la progression tumorale et l'angiogenèse suggère que l'anticorps anti-S1P pourrait être utilisé en clinique en ajout de la chimiothérapie conventionnelle. (Visentin *et al.*, 2006).

III.2 Les Sphingolipides et la Sphingosine 1-phosphate dans le mélanome

a) Les Sphingolipides

Les SLs sont présents dans la peau en forte proportion. Ils participent à la formation de la barrière hydrique et régulent l'homéostasie des cellules de la peau. Néanmoins, peu d'études se sont penchées sur leur véritable rôle dans le mélanome cutané.

Les espèces sphingolipidiques les plus étudiées sont sans doute les glycosphingolipides car leur localisation à la surface de la cellule leur confère le rôle d'antigènes spécifiques des mélanomes (Portoukalian *et al.*, 1979). Des travaux de Weiss *et al.* ont montré que l'inhibition de la GCS par un agent pharmacologique empêchait la formation de tumeurs et de métastases dans un modèle murin de mélanome (Weiss *et al.*, 2003). Récemment une étude a mis en évidence un dérivé du GM3, le D-N-acétyl-GM3 comme un marqueur spécifique des mélanomes métastatiques capable de stimuler la migration et l'invasion des cellules de mélanome humain (Liu *et al.*, 2009). D'autre part, l'expression du ganglioside GD3 a été associée au pouvoir invasif des mélanomes (Thomas *et al.*, 1996) ce qui explique que l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-GD3 murins se traduit par un ralentissement de la croissance et de la progression des tumeurs mélaniques (Birklé *et al.*, 2003).

En ce qui concerne les autres espèces ou enzymes du métabolisme des SLs, il a été montré que l'utilisation d'inhibiteurs de céramidases (Raisova *et al.*, 2002) ou de nanoliposomes chargés en céramide à courte chaîne (Tran *et al.*, 2008) conduisait à la mort des cellules de mélanome. De plus, notre équipe a récemment observé que la mortalité de cellules de mélanome A375 traitées par la dacarbazine était associée à une élévation des taux intracellulaires de céramide par défaut d'activité de la céramidase acide (Bedia *et al.*, 2010). Enfin, des xéno greffes de mélanome murin réalisées chez la souris invalidée génétiquement pour la SMase acide se traduit par une résistance à la radiothérapie due à un défaut d'apoptose des cellules endothéliales du microenvironnement tumoral (Garcia-Barros *et al.*, 2004).

b) La Sphingosine 1-phosphate

Des observations récentes ont montré que l'injection d'un anticorps monoclonal dirigé contre la S1P à des souris allogreffées avec le modèle de mélanome murin syngénique B16, induit une réduction du volume et de la vascularisation de la tumeur formée (Visentin *et al.*, 2006). Comme décrit précédemment, des résultats comparables ont été obtenus avec l'agent

FTY720, antagoniste fonctionnel des S1PRs (LaMontagne *et al.*, 2006) et décrit comme pouvant mimer la S1P et se fixer sur le récepteur S1P1 présent à la surface des cellules de la peau. Par ailleurs, la résistance de lignées de mélanome humain à l'apoptose induite par divers stress a été associée à des taux intracellulaires en S1P élevés et inversement diminués pour le céramide (Bektas *et al.*, 2005). De plus, notre équipe a récemment montré que l'expression du gène de la S1P Lyase (*Sgpl1*), enzyme qui dégrade la S1P, était diminuée dans diverses lignées de mélanome humain provenant de stades invasifs et métastatiques (Colié *et al.*, 2009). Enfin il existerait un lien étroit entre la S1P et le TGF β , un facteur de croissance décrit pour son rôle majeur dans les interactions mélanome-stroma (Yamanaka *et al.*, 2004).

L'ensemble de ces données montre que la S1P pourrait être impliquée dans le développement du mélanome. Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu par ce lysophospholipide dans cette tumeur restent à déterminer et constituent l'axe principal de mon projet de recherche.

MATERIELS ET METHODES

I. CULTURE CELLULAIRE

I.1 Lignées cellulaires

Toutes les lignées de mélanome humain utilisées lors de cette étude étaient issues soit de tumeurs primaires invasives (ou Vertical Growth Phase : VGP) pour les cellules : IC8, Mel Juso, UACC257, WM115, WM1346 soit de métastases pour les cellules : WM266.4, A375, COLO829, G361, SK Mel 28, MM455 et UACC903. Ces cellules ont été cultivées à 37°C sous 5% de CO₂ dans du milieu DMEM/Glutamax contenant 10% de SVF décomplémenté ou dans du milieu RPMI 1640 contenant 10% de SVF décomplémenté.

Les mélanocytes humains que nous avons utilisés sont constitués d'un pool issu de plusieurs individus adultes pour les NHEM-M2 et enfants pour les NHEM-f. Ces cellules nous ont été fournies par Promocell et ont été cultivées à 37°C sous 5% de CO₂ dans un milieu Dermal Cell Basal Medium supplémenté par différents produits présents dans le Melanocyte Growth Kit (ATCC). Les mélanocytes murins Melan-a ont été cultivés à 37°C sous 5% de CO₂ dans du milieu RPMI contenant 10% de SVF supplémenté par du PMA à 200nM.

Des cellules épithéliales de type HEK293T ont également été utilisées au cours de cette étude. Ces cellules ont été cultivées à 37°C sous 5% de CO₂ dans du DMEM contenant 10% de SVF décomplémenté.

I.2 Transfections transitoires et stables

a) Transfections transitoires

- Par des siRNAs :

Les cellules de mélanome ont été transfectées de manière transitoire par des siRNAs fournis par Dharmacon. Pour éteindre l'expression des différentes protéines (BRaf et SK1), nous avons utilisé un mélange de 4 siRNAs (ON-TARGETplus SMARTpool) dont les séquences respectives sont :

BRaf : 5'-CAUGAAGACCUCACAGUAA-3', 5'-UCAGUAAGGUACGGAGUAA-3', 5'-AGACGGGACUCGAGUGAUG-3', 5'-UUACCUGGCUCACUAACUA-3'.

SK1 : 5'-CGACGAGGACUUUGUGCUA-3', 5'-GAUGGGGAAUUGAUGGUUA-3', 5'-GAAAUCUCCUUCACGCUGA-3', 5'-GGAAAGGUGUGUUUGCAGU-3'.

Un pool de 4 siRNAs « contrôle » de chez Darmacon a également été utilisé mais le fabricant ne précise pas les séquences qu'il contient.

Les transfections ont été réalisées dans des plaques 24 puits pour les tests de viabilité ou de cicatrice et dans des flasks de 25 cm² pour les westerns blots. Des siRNAs ont été mélangés dans 100 µL de DMEM sans sérum avec 3 µL ou 35 µL de réactif Hiperfect (Qiagen) selon la surface utilisée (respectivement 2 et 25 cm²) pour atteindre des concentrations finales de 10, 20 nM ou 100 nM. Ce mélange a été incubé pendant 10 min à température ambiante puis a été ajouté aux cellules cultivées dans du DMEM à 10% de SVF. L'extinction optimale des différentes protéines a été observée après 72h de transfection.

- Par des plasmides :

Les cellules épithéliales HEK293T ont été transfectées de manière transitoire par un plasmide vide pcDNA3.1 ou contenant le cDNA codant pour la protéine BRAF humaine (sous sa forme sauvage ou une forme mutée en V600E rendant la kinase constitutivement active). La transfection a été permise grâce au réactif Lipofectamine 2000 selon le protocole suivant : 8 µg d'ADN plasmidique dilués dans 500µL de DMEM ont été mélangés avec 25 µL de Lipofectamine également dilués dans 500 µL de DMEM. Le mélange a alors été incubé pendant 20 min à température ambiante avant d'être ajouté sur les cellules cultivées dans du DMEM à 10% de SVF. La surexpression optimale des différentes protéines a été observée après 72h de transfection.

A partir de là, les cellules transfectées transitoirement ont été soit récupérées en vue d'une analyse ultérieure en Western blot ou en RT-PCR, soit traitées par un inhibiteur spécifique des MEK, le PD98059 (Sigma) à la concentration de 50 µM pendant 24h avant d'être récupérées.

b) Transfections stables

Les cellules de mélanocytes murins (Melan-a) et de mélanome humain (COLO829) ont été transfectées par un plasmide vide pcDNA3.1 ou contenant le cDNA codant pour la SK1 humaine (sous sa forme sauvage ou une forme mutée en G82D rendant l'enzyme inactive). La transfection a été réalisée sur des cellules confluentes à 70% grâce à du Jet PEI (Polyplus) selon le protocole suivant : tout d'abord, 4 µg de plasmide et 250 µl de NaCl 150 mM ont été mélangés puis dans un deuxième tube 8 µL de Jet PEI et 250 µL de NaCl 150 mM. La dilution de Jet PEI a ensuite été ajoutée au mélange d'ADN avant d'incuber 20 min à

température ambiante. Le mélange a alors été ajouté sur les cellules cultivées dans du RPMI à 10% de SVF. 3h après la transfection, le milieu a été remplacé par du milieu de culture habituel. 48h plus tard, le milieu de culture a été remplacé par du RPMI 10% SVF (+ PMA 200 nM pour les Melan-a) contenant 750 µg/mL de G418, nécessaire à la sélection des cellules transfectées.

II. ETUDE DE LA RESISTANCE CELLULAIRE AU TRAITEMENT PAR LA DACARBAZINE

II.1 Traitement par la Dacarbazine

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à raison de 10000 cellules par puits dans du DMEM à 10% de SVF. Après 24 h, le milieu a été remplacé par du DMEM sans sérum (100 µL par puits) avant le traitement par l'agent cytotoxique. La Dacarbazine (Sigma) a été préalablement mise en suspension dans du DMEM sans sérum à une concentration de 15 mg/mL. Des dilutions successives ont été réalisées à partir de cette solution pour former une gamme de concentrations décroissantes à partir desquelles 10 µL ont été prélevés puis ajoutés dans les puits pour donner des concentrations finales de : 0, 25, 50, 100, 250, 500, 750 et 1000 µg/mL. Après 48 h de traitement, la viabilité des cellules a été mesurée par un test au MTT.

II.2 Test de viabilité cellulaire

Le MTT est un sel de tétrazolium soluble jaune qui est réduit par les enzymes de la chaîne respiratoire en cristaux de formazan insolubles et bleus. Le MTT (500 µg/mL) a été ajouté aux cellules pendant 1 h à 37°C. Le milieu a ensuite été retiré et les cristaux ont été dissous dans 100 µL de DMSO. L'intensité de coloration a été mesurée par spectrophotométrie à 560 nm. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de viabilité par rapport aux cellules non traitées.

III. ETUDE DE LA MIGRATION CELLULAIRE

Les différents types cellulaires ont étéensemencés dans des plaques 24 puits à raison de 100 000 cellules par puits pour obtenir une confluence suffisante. Après 24 h, le milieu de culture (DMEM 10% SVF ou RPMI 10% SVF) a été remplacé par du milieu à 1% de SVF. Une « plaie » a alors été réalisée dans la monocouche cellulaire sur toute la longueur du puits

grâce à une pointe de pipette. Le test de la cicatrice a aussi été réalisé soit en présence d'un inhibiteur des SKs, le SKI (Calbiochem) à la concentration de 5µM sur des cellules A375, soit en présence du FTY720 (Cayman Chemical Company) à la concentration de 2,5 mM sur des cellules COLO829.

Des clichés ont alors été pris aux temps 0 et 24h. L'analyse de la migration a été faite en comparant le nombre de cellules présentes dans la cicatrice aux temps 0 et 24h.

IV. ETUDE DE LA SECRETION DE S1P

Les cellules de mélanome COLO829, transfectées de façon stable par un plasmide vide pcDNA3.1 ou contenant le cDNA codant pour la SK1 humaine, ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 400 000 cellules par puits. Lorsque la confluence a atteint 70%, le dosage extracellulaire de S1P a été réalisé à l'aide de sphingosine radioactive selon le protocole de Mitra (Mitra *et al*, 2007). Pour chaque condition testée, les cellules ont été incubées à 37°C en présence de RPMI sans SVF contenant de la D-érythro-[3-³H]sphingosine (0,45 µCi/mL) et de la sphingosine froide. Cette étape permet l'incorporation de la sphingosine dans les cellules. Après 15 min, le milieu a été retiré, les cellules ont été lavées deux fois au PBS froid puis incubées 1h à 37°C dans du RPMI sans SVF.

La radioactivité contenue dans les milieux surnageants a été évaluée après extraction des lipides dans un mélange de CH₃OH/CHCl₃/NaOH, centrifugation de ce mélange et comptage de la phase supérieure en scintillation liquide.

Pour mesurer la radioactivité associée aux cellules, celles-ci ont été rincées au PBS froid puis incubées à 4°C en présence de CH₃OH. Après 10 min, les cellules ont été récupérées et soniquées avant d'ajouter une solution de CHCl₃/NaCl 1M/NaOH 3N. Après agitation et centrifugation de ce mélange, 100 µL de phase supérieure ont été analysés en scintillation liquide. La sécrétion de S1P tritiée a été exprimée en pmol/min/mg de protéines.

V. ANALYSE DE L'EXPRESSION DU GENE *SPHK1* OU *SGPL1* PAR RT-QPCR

A partir de cultures non confluentes de lignées de mélanome humain et de mélanocytes normaux dérivés de peau adulte (NHEM-M2) ou d'enfant (NHEM-f), les ARNs totaux ont été extraits par le kit RNeasy mini kit (Qiagen). Après traitement à la DNase, la transcription inverse a été réalisée en utilisant des oligos(dT) (Promega) et la Superscript II (Invitrogen). Les ADNc obtenus ont été amplifiés sur le plateau de transcriptomique

quantitative de l'IFR150-BMT grâce au Lightcycler StepOne (Applied Biosystems) en suivant un programme de 30 cycles de PCR en temps réel avec le kit PCR SYBR Green et les primers (Quantitect ; Qiagen). Les résultats ont été normalisés à l'aide de gènes de ménage (TATA Binding Protein, Transferrin Receptor et β -actine).

VI. ANALYSE IMMUNOHISTOCHIMIQUE

Les coupes de peau ont été réalisées à partir de prélèvements effectués sur des patients atteints de mélanome cutané. Au total, 19 naevi et 30 mélanomes ont été analysés. Le marquage de la SK1 a ensuite été réalisé sur un automate (Techmate) à l'Institut Claudius Regaud. L'anticorps primaire a été dilué au 75^{ème}. La révélation a été réalisée grâce à un anticorps secondaire couplé à la peroxydase.

VII. WESTERN BLOT

VII.1 Les anticorps utilisés

Les différents anticorps utilisés au cours de cette étude nous ont été fournis par :

- Cell Signaling Technology pour p42/44 MAPK, MAPKs totales et BRaf;
- Sigma pour SK1 et β -actine.

VII.2 La technique

Après traitement, les cellules ont été récupérées puis centrifugées. Les culots cellulaires lavés au PBS et conservés à -80°C ont ensuite été incubés dans la glace pendant 30 min dans un tampon (Cell Signaling Technology) supplémenté de PMSF (1mM) et d'un cocktail d'anti-protéases (Roche) puis centrifugés 10 min à 10000 rpm à 4°C. Les protéines du surnageant ont été dosées par la méthode de Bradford. 25 μ g de protéines dénaturées ont été déposés sur gel SDS-PAGE à 10% pour la migration, suivie d'un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose. Cette membrane a été ensuite saturée dans du TBS Tween 0,1% lait 5% avant d'incuber avec l'anticorps primaire toute la nuit à 4°C. La révélation par chimiluminescence (kit Pierce) a été réalisée après incubation de la membrane avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase.

VIII. MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SPHINGOSINE KINASE 1

Les culots cellulaires ont été lysés dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7.4 supplémenté de 20 % glycérol, 1 mM β mercaptoéthanol, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 15 mM NaF, 1 mM orthovanadate de sodium, 40 mM β glycérophosphate, 10 μ g /mL leupeptine, 10 μ g/mL Aprotinine et 0,5 mM 4-déoxypyridoxine. Les extraits protéiques ont été soniqués puis dosés par Bradford. L'activité SK a été déterminée en présence de 1 mM sphingosine, 0,25% Triton X100 et d'un mélange contenant 200 mM MgCl₂, 20 mM ATP et 10 μ Ci [γ -³²P]-ATP. Après 30 min d'incubation à 37°C, la réaction enzymatique a été stoppée par des lavages suivis de centrifugations et la phase inférieure a été évaporée sur la nuit. La S1P radiomarquée a été ensuite séparée par chromatographie sur couche mince sur gel de silice dans une phase mobile composée de Butanol/Ethanol/Acide acétique/Eau (80 :20 :10 :20). Le signal a été mesuré par autoradiographie. L'activité spécifique a été exprimée en pmoles de S1P formée/min/mg de protéines.

IX. ANALYSE DE L'EXPRESSION DU GENE *BRAF* PAR RT-PCR

A partir de cultures de cellules épithéliales HEK293T transfectées de façon transitoire par le plasmide vide pcDNA3.1 ou contenant le cDNA codant pour la protéine BRAF (wild-type ou mutée en V600E), les ARNs totaux ont été extraits par le kit RNeasy mini kit (Qiagen). Après traitement à la DNase, la transcription inverse a été réalisée en utilisant des oligos(dT) (Promega) et la Superscript II (Invitrogen). Les ADNc obtenus ont été amplifiés par 30 cycles de PCR en utilisant les primers suivants : primer sens : 5' CAATTTGGGCAACGAGACCG 3' et primer antisens : 5' CTCTTGAGGTCTCTGTGGATG 3'. La réaction a été réalisée selon le programme suivant : dénaturation du mélange pendant 5 min à 95°C, puis une hybridation de 30 cycles de 45 sec à 95°C, 1 min à 58°C, 1 min à 72°C. L'élongation finale a été réalisée par un cycle de 7 min à 72°C. La révélation a été effectuée par migration des produits PCR sur un gel d'agarose à 0,8%, suivie d'un marquage au SYBR Green.

X. CYTOMETRIE EN FLUX

Les cellules ont été sédimentées, incubées pendant 10 minutes avec 250 ng/mL d'Annexine V-APC (AnV) et 50 ng/mL d'iodure de propidium (Immunotech Beckman Coulter) et analysées par cytométrie en flux (BD FACSCalibur). Les cellules apoptotiques,

présentant une externalisation des phosphatidylsérines sont AnV+ alors que les cellules nécrotiques sont IP+.

XI. ANALYSES STATISTIQUES

La significativité des différences entre les moyennes a été évaluée par le test t de Student. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque $p < 0,05$ (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

Dans le mélanome, la mutation V600E de la kinase BRAf conduit à l'activation constitutive de la voie des MAPKs et *in fine* à une hyperprolifération cellulaire (Fecher et *al.*, 2007). La combinaison de cet événement mutationnel avec la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs comme la phosphatase PTEN représente un processus clé dans l'oncogenèse et le pouvoir métastatique du mélanome. Or, la SK1 est un puissant activateur des MAPKs et nous avons observé que le déficit en S1P lyase était associé à la phosphorylation/inactivation de PTEN (données non publiées).

L'objectif général de ce travail était donc d'étudier l'influence des enzymes du métabolisme de la S1P sur la signalisation mitogénique, la migration et la chimiorésistance des mélanomes en ciblant plus particulièrement la voie de signalisation contrôlée par BRAf.

Plus spécifiquement, dans un premier temps nous avons regardé le profil d'expression et d'activité des enzymes du métabolisme de la S1P dans des lignées cellulaires de mélanome et des mélanocytes humains ainsi que dans des tissus tumoraux ou sains provenant de patients atteints ou non de mélanomes. Puis, nous avons étudié le rôle de la SK1, l'enzyme de production de la S1P, dans la migration de mélanocytes murins et de cellules de mélanome humain ainsi que dans la résistance de ces cellules au traitement par le DTIC. Enfin, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires qui relient l'activation des enzymes du métabolisme de la S1P aux voies de signalisation activées par la protéine BRAf.

II. ETUDE DU METABOLISME DE LA S1P DANS LES CELLULES DE MELANOME

II.1 Profil d'expression des gènes SPHK1 et SGPL1 dans des lignées de mélanome et de mélanocytes

L'analyse de l'expression des gènes de *SPHK1* et *SGPL1* a pu être réalisée à partir de différentes lignées de mélanome cutané invasif ou métastatique en comparant les taux d'ARNm dans ces lignées avec les taux obtenus dans des mélanocytes humains normaux d'adultes (NHEM-M2) ou d'enfants (NHEM-f). La figure 17 montre que, tandis que l'expression de *SPHK1* est augmentée dans la majorité des lignées, l'expression de *SGPL1* tend au contraire à diminuer dans les lignées tumorales comparées aux lignées saines. La comparaison faite avec les mélanocytes issus d'individus adultes ou avec des cellules issues d'individus plus jeunes reste sensiblement la même. Enfin, il semble que l'expression de

SPHK1 varie en fonction du degré de malignité avec des valeurs plus importantes obtenues pour 3 métastases sur 5.

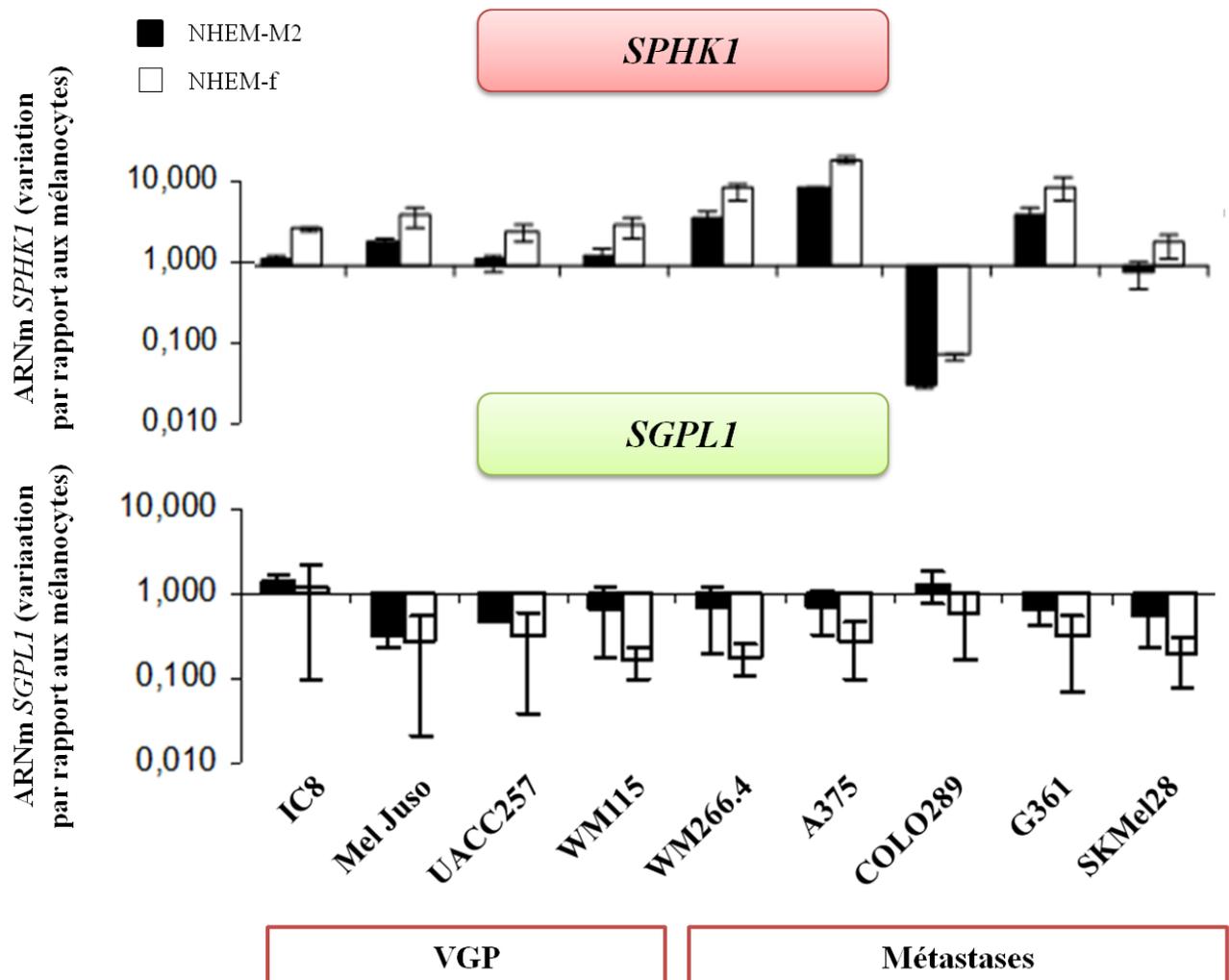


Figure 17 Augmentation des taux d'ARNm de *SPHK1* et diminution des taux d'ARNm de *SGPL1* dans les cellules de mélanome par rapport aux mélanocytes sains

Les taux d'ARNm de *SPHK1* et *SGPL1* ont été quantifiés par PCR quantitative en temps réel dans des lignées de mélanome issues de tumeurs primaires invasives (Vertical Growth Phase ; VGP) ou de métastases. Ces taux ont été comparés à ceux obtenus dans des mélanocytes humains d'adultes (NHEM-M2) et d'enfants (NHEM-f). Ces résultats correspondent à la moyenne \pm SEM de 2 expériences indépendantes réalisées en double.

II.2 Profil d'expression de la SK1 dans des lignées de mélanome et de mélanocytes

Suite à cette première observation, nous avons analysé par Western blot le profil d'expression de la protéine SK1 dans des lignées de mélanome et nous l'avons comparé à l'expression de la kinase dans la lignée de mélanocytes humains PSC-200-012. La figure 18A confirme qu'il existe une expression plus forte de la SK1 dans les cellules tumorales par rapport aux cellules saines hormis dans deux lignées de mélanome : COLO829 et IC8. Nous

constatons que pour la lignée COLO829, l'expression de l'ARNm de *SPHK1* est bien corrélée à l'expression protéique de l'enzyme (Figure 17).

Afin de vérifier que l'expression de SK1 pouvait être altérée *in situ*, nous avons réalisé un marquage immunohistochimique de cette enzyme à partir d'échantillons prélevés sur des patients atteints de mélanome cutané (collaboration avec le Dr Rochaix, Institut Claudius Regaud). La figure 18B montre une coupe de peau ayant des zones histologiques bien définies : d'une part, les cellules tumorales et d'autre part, les naevi sains. Sur cette image, on constate que la SK1 est très nettement surexprimée dans la région envahie par le mélanome par rapport aux zones saines. La totalité des analyses réalisées sur coupes de peau est représentée dans le diagramme. L'expression de la SK1 est significativement plus élevée dans les zones tumorales en comparaison avec le tissu sain.

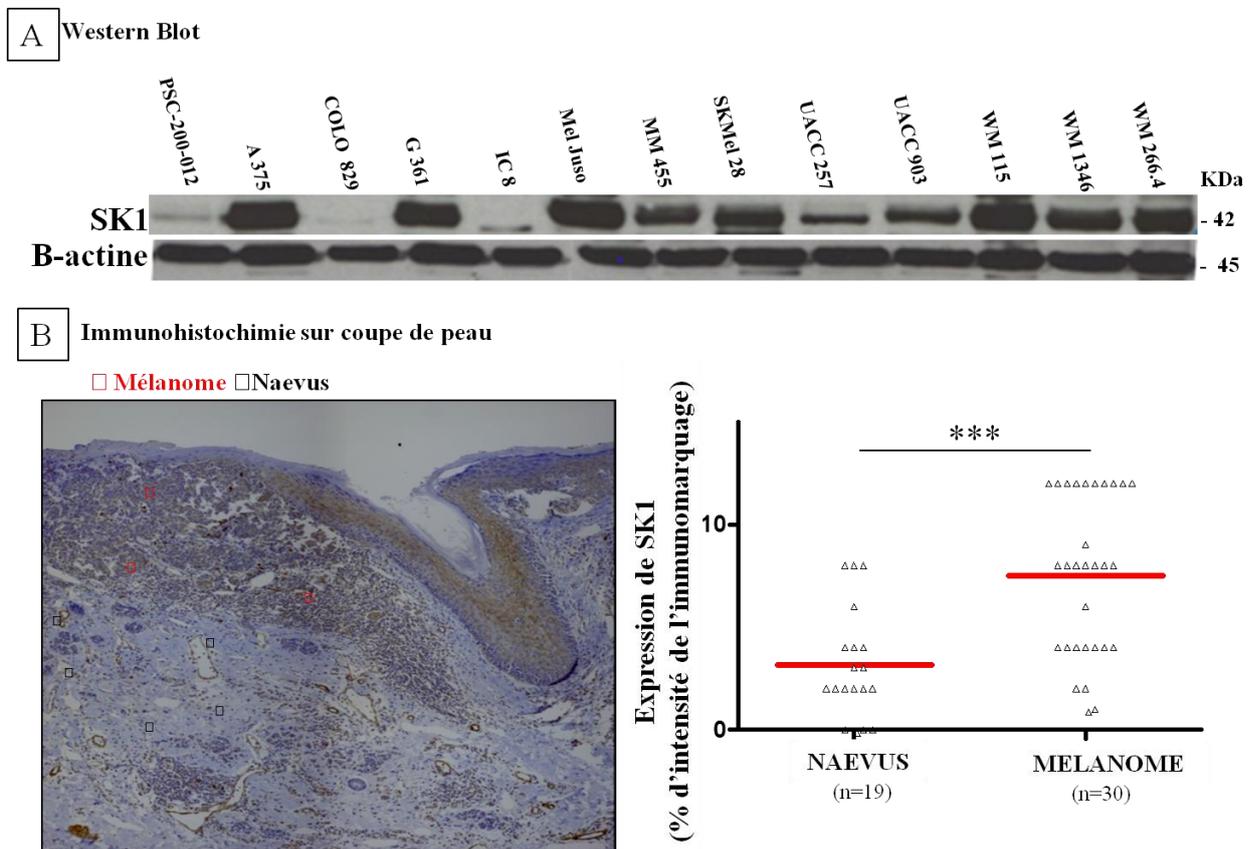


Figure 18 L'expression de la SK1 est augmentée dans le mélanome par rapport aux cellules saines

(A) Etude de l'expression de la SK1 par Western Blot dans des lignées de mélanome humain.

(B) Etude par immunohistochimie de l'expression de la SK1 sur des coupes de peau présentant des lésions de mélanome (carrés rouges) et des naevi (carrés noirs). La photo est tirée de l'analyse de 49 coupes. Le diagramme représente l'expression de la SK1 en pourcentage d'intensité du marquage par l'anticorps anti-SK1. Il a été réalisé sur 19 naevus et 30 mélanomes et la barre rouge représente la moyenne des résultats.

II.3 Profil d'activité de la SK1 dans des lignées de mélanome et de mélanocytes

Pour compléter cette étude, le dosage de l'activité enzymatique de la SK1 a été réalisé. Comme le montre la figure 19, l'activité de la SK1 est nettement augmentée dans les lignées tumorales par rapport aux mélanocytes humains sains PSC-200-012. Toutefois l'activité SK1 ne semble pas influencée par le statut du mélanome (VGP ou métastatique). Une fois de plus, la lignée COLO829 se distingue des autres lignées par son profil enzymatique qui est parfaitement corrélé aux précédentes observations sur l'expression de la SK1 (ARNm et protéine).

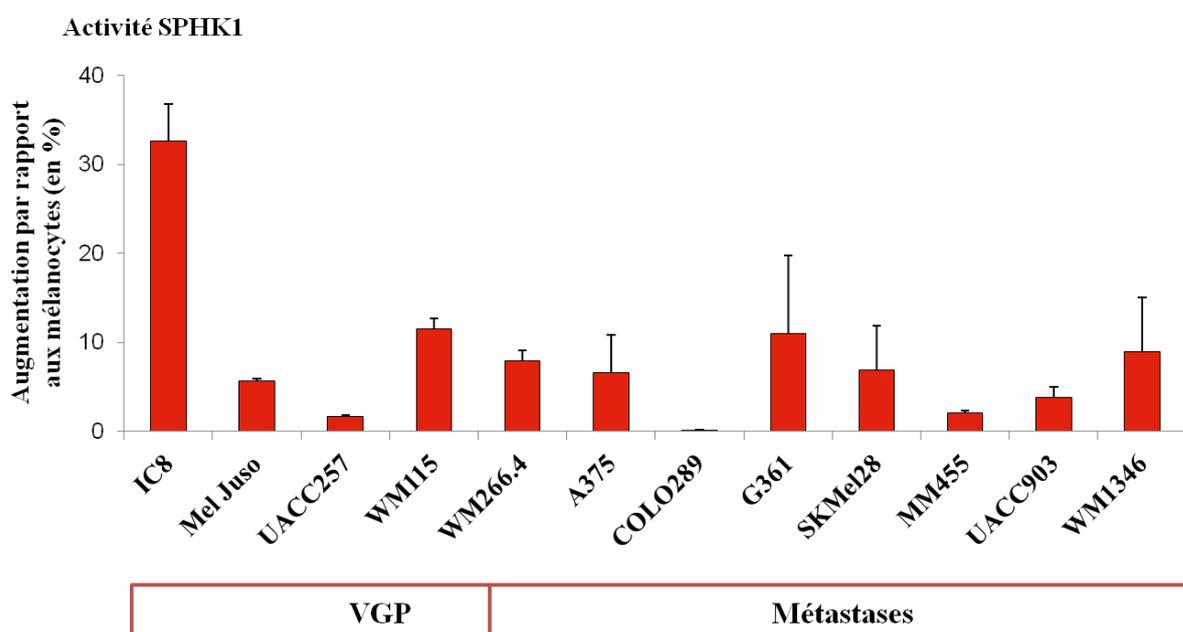


Figure 19 L'activité enzymatique de la SK1 est augmentée dans les cellules de mélanome par rapport aux mélanocytes sains

Le diagramme ci-dessus représente l'activité enzymatique de la SK1 dans les cellules de mélanome rapportée à celle mesurée dans des mélanocytes sains PSC-200-012. Cette activité est initialement exprimée en pmol de S1P radioactive formée par mg de protéines et par minute. Ces résultats correspondent à la moyenne (+ESM) de deux expériences.

L'ensemble de ces résultats démontre qu'il existe dans le mélanome des variations de l'expression et de l'activité des enzymes du métabolisme de la S1P par rapport aux mélanocytes sains avec une tendance à l'augmentation de l'expression de la SK1 et à l'inverse une baisse de l'expression de la S1P lyase.

III. ETUDE DU ROLE DE S1P/SK1 SUR LA MIGRATION CELLULAIRE

III.1 Après variation de l'expression de SK1

Au cours de la progression du mélanome, les cellules tumorales d'origine épidermique doivent franchir la jonction dermo-épidermique qui sépare l'épiderme du derme et envahir le derme, son principal site de propagation. Son caractère agressif repose donc sur la capacité des cellules de mélanome à migrer.

Nos travaux montrent que l'expression de SK1 est altérée dans le mélanome en faveur d'une production accrue de S1P. Or ce lipide oncogénique favorise la migration de nombreux types cellulaires (cf chapitre 2 III.1.b). Nous nous sommes alors interrogés sur le rôle de la S1P, accumulée dans les cellules de mélanome, sur la migration de celles-ci.

A partir de mélanocytes murins, nous avons étudié les effets de la surexpression de la SK1 sur la migration de ces cellules. Pour cela, les cellules Melan-a ont été transfectées de façon stable soit par le plasmide pcDNA3.1 vide, soit par le plasmide pcDNA3.1 codant pour la SK1 sauvage ou portant la mutation G82D qui rend la kinase catalytiquement inactive. La surexpression de la SK1 a été vérifiée par Western blot (Figure 20A). La migration de ces cellules a été évaluée grâce à un test de « cicatrice », qui consiste à créer une zone dépourvue de cellules au sein d'une culture confluente et d'étudier la capacité des cellules à envahir la plaie. Après 24h de migration dans un milieu contenant 1% de SVF, des clichés ont été réalisés. La figure 20A montre que lorsque les mélanocytes de souris expriment une SK1 fonctionnelle, leur capacité migratoire est fortement augmentée par rapport à des cellules contrôles ou des cellules qui expriment une SK1 inactive.

De manière réciproque, nous avons analysé les effets de l'inhibition de SK1 dans plusieurs lignées de mélanome humain en utilisant différentes approches :

1- une inhibition pharmacologique de la kinase par le SKI dans des cellules de mélanome humain A375. L'inhibiteur a été ajouté sur les cellules une fois la plaie réalisée et des clichés ont été pris après 24h de migration. La migration a été évaluée en comptant le nombre de cellules ayant migré pour chaque condition (Figure 20B).

2- et une inhibition par RNA interférence dans des cellules de mélanome A375, SKMel28 et WM115. Après 72h de traitement par un siRNA dirigé contre la SK1 ou par un siRNA contrôle, la plaie a été réalisée. 24h plus tard, des clichés de la cicatrice ont été pris. La figure 20C montre que l'inhibition de l'expression de la SK1, vérifiée par un Western blot, diminue la capacité des cellules de mélanome à migrer dans la cicatrice. La migration peut aussi être

évaluée par comptage des cellules dans la cicatrice. La figure 20D montre que l'inhibition de la SK1 dans les trois lignées de mélanome diminue la migration de ces cellules d'environ 20 à 30% par rapport à leur contrôle (Figure 20D).

Nos résultats montrent que l'inhibition de SK1 dans les cellules de mélanome est associée à une diminution de la migration de ces cellules. Nous pouvons donc conclure que les variations d'expression de l'enzyme qui synthétise la S1P influent sur la capacité des cellules à migrer.

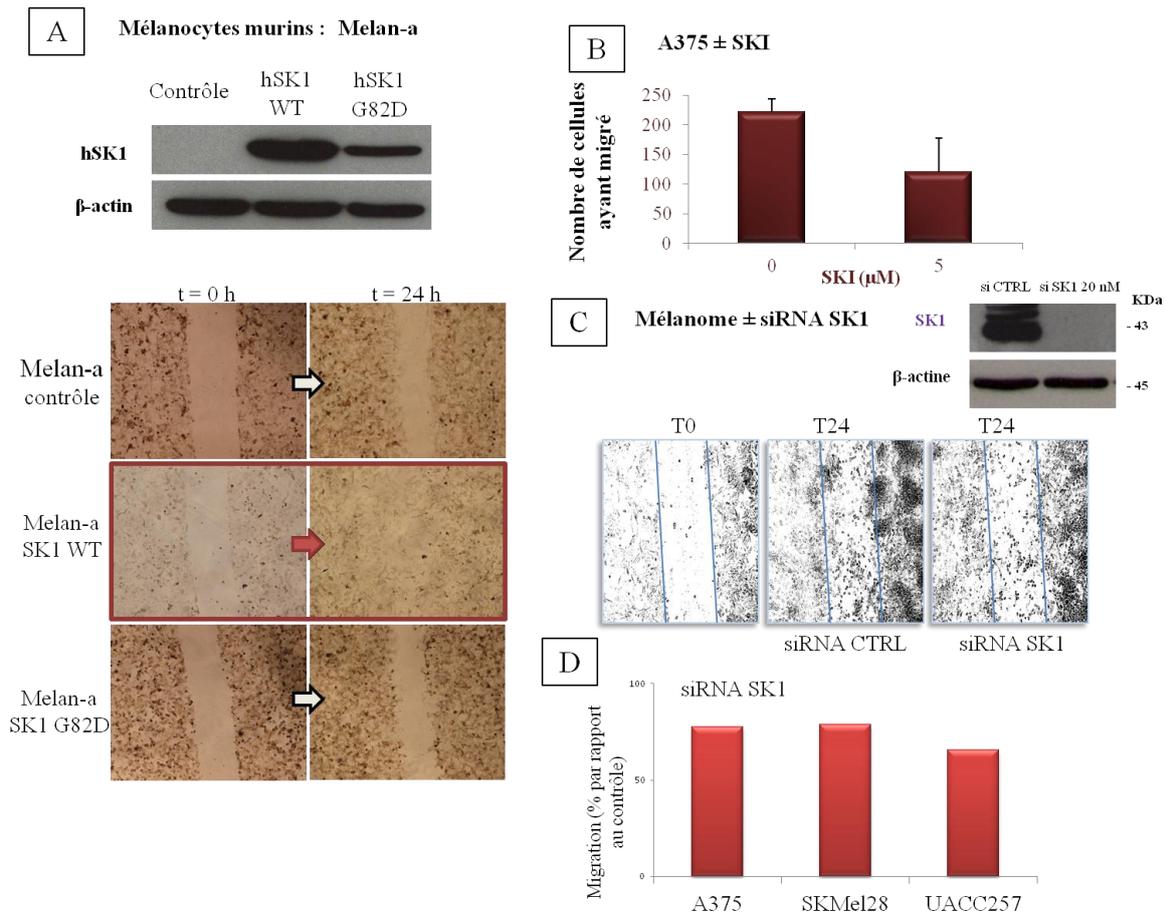


Figure 20 La surexpression de SK1 stimule la migration des mélanocytes murins et à l'opposé son inhibition réduit la capacité des cellules de mélanome à migrer

(A) L'expression de la SK1 dans les mélanocytes Melan-a contrôle, hSK1 WT et hSK1 G82D a été vérifiée par Western Blot. L'analyse de la migration a été réalisée sur des photos prises 24h après avoir réalisé la cicatrice.

(B) Une fois la cicatrice réalisée, les cellules de mélanome A375 ont été traitées pendant 24h par le SKI à la concentration de 5μM ou par le même volume de DMSO pour le contrôle. Les résultats de la migration, évalués sur 4 clichés/condition, correspondent à la moyenne du nombre de cellules ayant migré.

(C) L'inhibition de l'expression de la SK1 par un siRNA contrôle ou par un siRNA dirigé contre SK1 dans des cellules de mélanome A375 a été vérifiée par western blot. La migration de ces cellules a été évaluée 72h après la transfection par le siRNA. Les photos correspondent à la migration à 24h des cellules A375.

(D) La migration des trois types cellulaires de mélanome (A375, SKMel28, UACC257) a été évaluée 72h après la transfection par un siRNA contrôle ou un siRNA dirigé contre SK1. Le diagramme représente la migration des trois lignées en pourcentage par rapport aux cellules contrôles (100%).

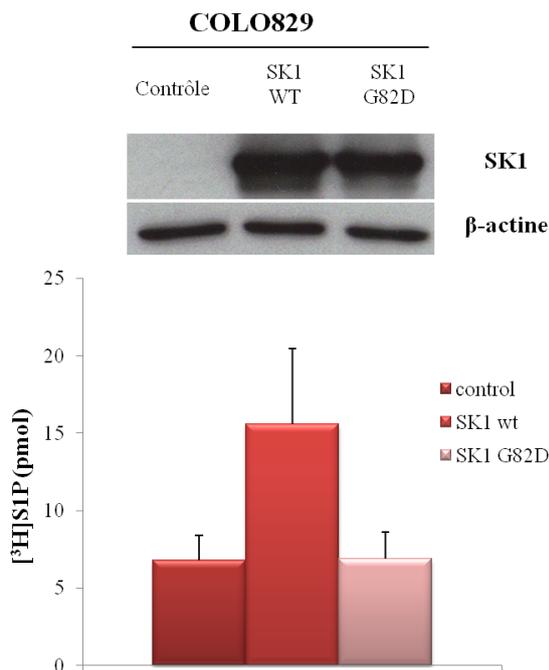
III.2 Après blocage des récepteurs S1PRs

Afin de déterminer si la S1P induit la migration des cellules de mélanome via la sécrétion de S1P puis sa fixation sur les récepteurs S1PRs, nous avons transfecté de façon stable les cellules de mélanome COLO829 soit par le plasmide pcDNA3.1 vide, soit par le plasmide pcDNA3.1 codant pour la SK1 sauvage ou mutée en G82D. Cette lignée a été sélectionnée car elle n'exprime pas la SK1 à l'état basal (cf figure 17 et 18A). Par contre, avons montré récemment par qPCR qu'elle exprimait à sa surface les récepteurs S1P1, S1P2 et S1P3 (résultats non montrés).

La surexpression de la SK1 a été vérifiée par Western blot (Figure 21A). A partir de ces trois clones, nous avons évalué leur capacité à sécréter de la S1P. L'analyse des surnageants de culture montre que les COLO829 qui surexpriment la SK1 sauvage sécrètent davantage de S1P que les cellules contrôles ou exprimant une enzyme catalytiquement inactive (Figure 21A).

Afin d'étudier si la S1P sécrétée pouvait influencer la migration des cellules de mélanome, nous avons évalué la capacité des COLO829 SK1 WT à migrer en présence ou en l'absence de FTY720, un antagoniste des S1PRs. Après 24h de migration, des clichés ont été réalisés. La figure 21B montre qu'en présence de FTY720, les capacités migratoires des cellules exprimant SK1 sont fortement diminuées. Cette observation suggère que la S1P sécrétée serait capable d'agir de façon autocrine et/ou paracrine via les récepteurs S1PRs en favorisant la migration cellulaire.

A Sécrétion de S1P par les cellules de mélanome



B Test de la cicatrice

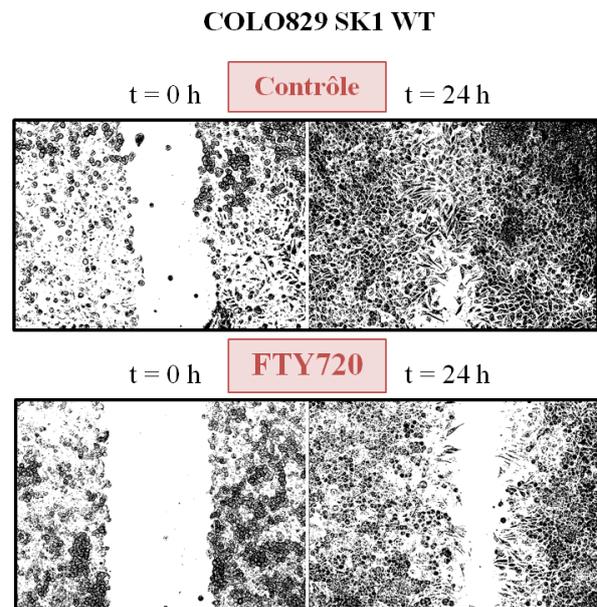


Figure 21 La S1P sécrétée agit de façon autocrine via les S1PRs et favorise la migration des cellules de mélanome

(A) La surexpression de la SK1 sauvage ou mutée dans les cellules de mélanome COLO829 a été vérifiée par Western Blot dans les trois clones. Pour mesurer la sécrétion de S1P, les cellules ont été incubées 15min avec la sphingosine tritiée et la radioactivité contenue dans les surnageants de culture a ensuite été mesurée.

(B) Les COLO829 surexprimant la forme sauvage de la SK1 ont été traitées pendant 24h avec le FTY720 à la concentration de 2,5 mM ou par le même volume d'éthanol pour les cellules contrôles. L'analyse de la migration a été réalisée sur des photos prises 24h après avoir réalisé la plaie.

IV. ETUDE DU ROLE DE SK1 SUR LA CHIMIORESISTANCE DU MELANOME

Dans le mélanome, lorsque la tumeur est bien installée ou disséminée, les traitements radio- ou chimiothérapeutiques n'amènent généralement qu'une guérison incomplète, souvent suivie de rechutes fatales. En effet, ce cancer ne possède qu'une très faible sensibilité aux thérapies conventionnelles et ceci constitue une des raisons majeures d'échec des traitements anticancéreux.

Dans cette étude, nous avons évalué le rôle de SK1 dans la résistance des cellules de mélanome à la Dacarbazine (DTIC), un agent alkylant de l'ADN, utilisé en routine dans le traitement du mélanome cutané (cf chapitre 1 II.5). Pour cela, les cellules WM115, Mel Juso et SKMel28, ont été traitées par un siRNA dirigé contre la SK1 ou par un siRNA contrôle. Après 24h de traitement, les cellules ont été stimulées avec 750 µg/mL de Dacarbazine. La viabilité a été mesurée 48h après par un test au MTT (Figure 22A). D'après la figure 22B, les

cellules traitées par le siRNA dirigé contre la SK1 résistent moins bien au traitement par la Dacarbazine.

Réciproquement, nous avons étudié l'effet de la surexpression de SK1 sur la résistance des cellules de mélanome en évaluant la réponse au DTIC des COLO829 surexprimant la SK1. Dans les cellules COLO SK1 WT qui produisent (et sécrètent) de la S1P, nous avons observé une résistance accrue à l'agent alkylant en comparaison avec des cellules transfectées par un plasmide vide (COLO pcDNA3.1) ou par la forme mutée de SK1 (COLO SK1 G82D) (Figure 22C). Ceci a été confirmé en cytométrie de flux par la quantification du pourcentage de cellules marquées à l'annexine V qui reflète l'externalisation des phosphatidylsérines, une étape précoce de l'apoptose. En effet, seulement 2,9% des COLO SK1 WT sont AnV+/IP- comparées aux COLO pcDNA3.1 et COLO SK1 G82D pour lesquelles les pourcentages de cellules AnV+/IP- sont respectivement 7,3% et 19,9% (Figure 22D).

Ces données suggèrent qu'une forte activité SK1 rend les cellules de mélanome plus résistantes à la dacarbazine.

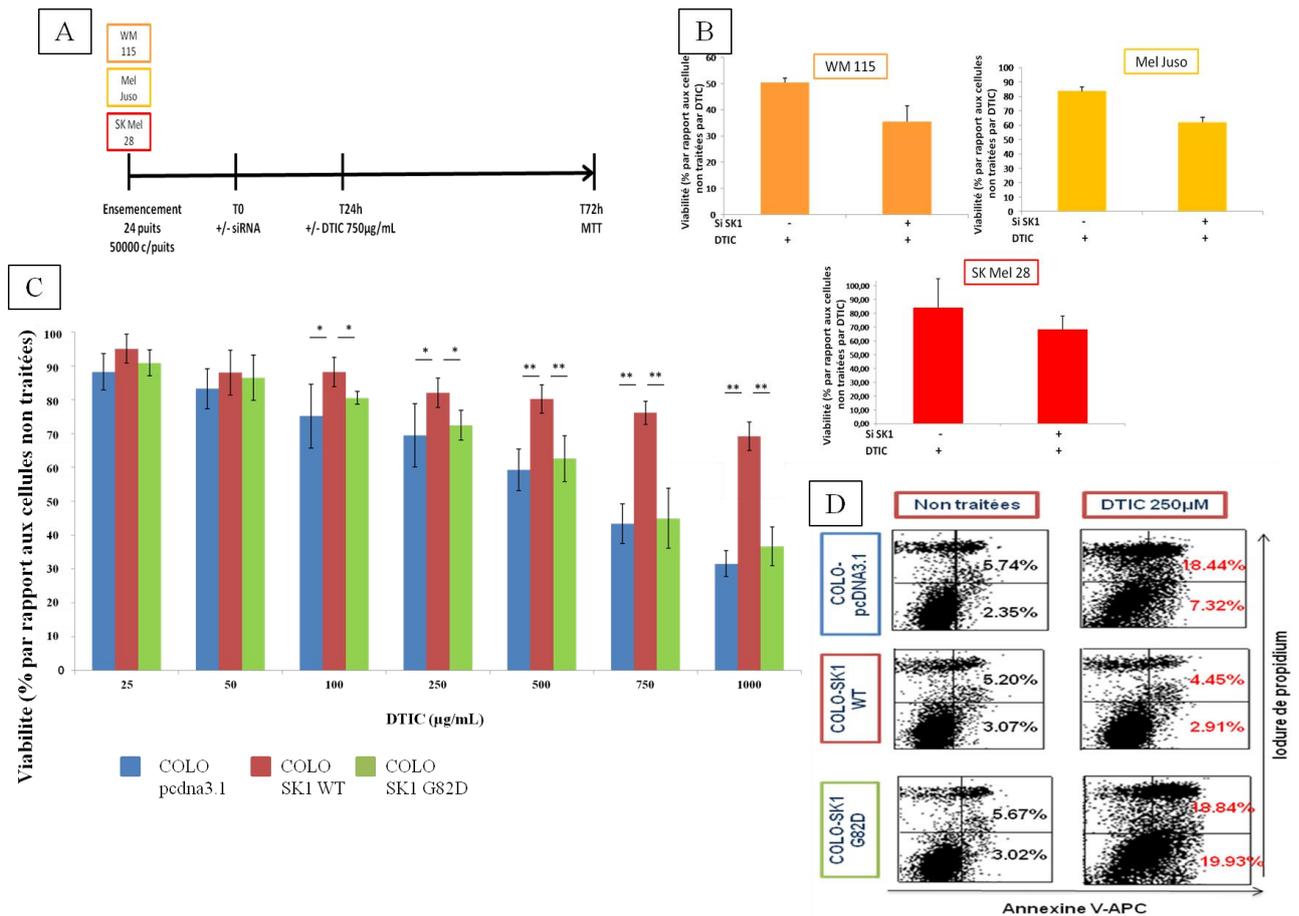


Figure 22 L'inhibition de la SK1 réduit la résistance des cellules au traitement par la Dacarbazine et sa surexpression l'augmente

(A) Un siRNA dirigé contre la SK1 (20 nM) ou un siRNA contrôle (20 nM) a été ajouté aux cellules dans du milieu DMEM à 10% de SVF. 24h après les cellules ont été traitées par 750 µg/mL de Dacarbazine dans du DMEM carencé en sérum pour les lignées WM 115 et Mel Juso ou supplémenté par 10% de SVF pour la lignée SK Mel 28. La viabilité a été mesurée 48h plus tard par un test au MTT. Elle est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées par la Dacarbazine (B).

(C) Les cellules de mélanome COLO pcDNA3.1, COLO SK1 WT ou COLO SK1 G82D ont été traitées par des doses croissantes de DTIC dans un milieu contenant 1% de sérum. La viabilité a été mesurée après 48h de traitement par un test au MTT. Elle est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées par l'agent cytotoxique.

(D) Après 48h de traitement au DTIC, les cellules de mélanome ont été marquées à l'annexine V-APC et à l'iodure de propidium puis analysées par cytométrie de flux. Les pourcentages des cellules AnV+ IP- (cellules en apoptose), AnV+ IP+ (cellules en apoptose tardive) sont représentés. Les résultats correspondent à la moyenne ± ESM de 3 expériences indépendantes.

V. EFFETS DE LA SUREXPRESSON OU DE L'INHIBITION DE BRAF SUR L'EXPRESSION DE SK1

Afin de comprendre les interactions moléculaires pouvant exister entre les voies de signalisation contrôlées par BRAf et par SK1, nous avons dans un premier temps exploré l'effet de la surexpression de BRAf sur l'expression de l'enzyme qui synthétise la S1P. Pour cela, nous avons transfecté de façon transitoire des cellules HEK293T par le plasmide pcDNA3.1 vide ou codant pour la forme sauvage ou la forme mutée de BRAf en V600E.

Après 72h de transfection, l'analyse en Western blot révèle que la surexpression de BRaf dans les HEK293T est associée non seulement à une nette augmentation de la phosphorylation des MAPKs (p42/44), mais également à une plus forte expression de la SK1. Nous remarquons également que cet effet est majoré lorsque les HEK293T surexpriment la forme oncogénique de BRaf (Figure 23A).

Pour éclaircir les mécanismes moléculaires qui relie BRaf à SK1, nous avons en parallèle traité ces mêmes cellules par un inhibiteur des MAPKs, le PD98059. La figure 23B montre que l'inhibition pharmacologique des MEKs dans les HEK293T qui surexpriment la forme sauvage de BRaf, s'accompagne d'une diminution de la phosphorylation des MAPKs associée à la baisse de l'expression de la SK1.

Dans un second temps, nous avons voulu savoir si l'inhibition de BRaf pouvait influencer l'expression de la SK1. Cette inhibition a été effectuée grâce à l'utilisation d'un siRNA dirigé contre la kinase BRaf. Plus précisément, nous avons incubé les cellules SK Mel 28 qui portent la mutation BRaf V600E avec le siRNA dirigé contre BRaf afin de bloquer dans ces cellules l'activation des MAPKs induite par la forme oncogénique de BRaf. La figure 23C montre que l'inhibition de BRaf se traduit par une forte diminution de l'expression de la SK1, associée à une diminution de la phosphorylation des MAPKs.

En résumé, ces résultats suggèrent l'existence d'une modulation de l'expression de la SK1 par l'oncogène BRaf à travers la phosphorylation des MAPKs.

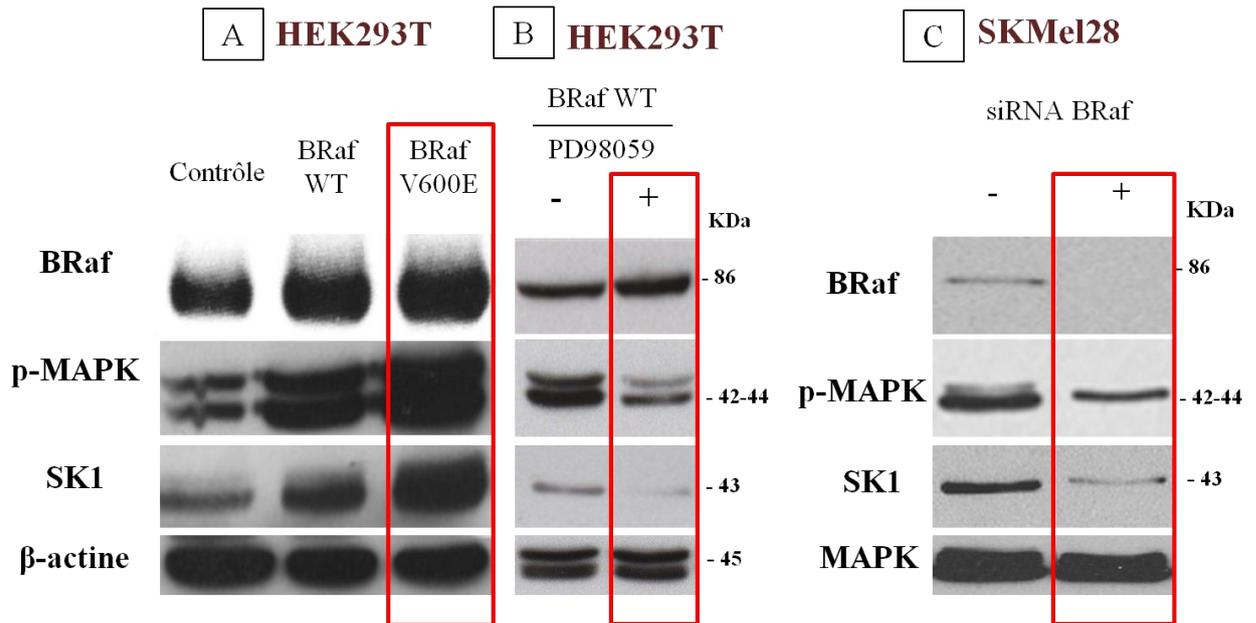


Figure 23 L'expression de SK1 est modulée par l'oncogène BRAf via la phosphorylation des MAPKs

L'expression des MAPKs, des phospho-MAPKs et de la SK1 a été évaluée par Western Blot :

- après 72h de transfection des HEK293T par le plasmide pcDNA3.1 vide ou codant pour la kinase BRAf sauvage ou mutée en V600E (A).

- après 72h de traitement des cellules SKMel28 par le siRNA dirigé contre BRAf ou par un siRNA contrôle (C).

L'expression de BRAf a été évaluée par RT-PCR (A) ou par Western Blot (B et C).

Le traitement des HEK293T surexprimant la forme sauvage de BRAf par l'inhibiteur des MEKs, le PD98059, a été réalisé à la concentration de 50 μ M pendant 16h (B).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

- Profil d'expression des enzymes du métabolisme de la S1P dans le mélanome

En comparant des lignées de mélanome et des mélanocytes sains humains, nous avons montré pour la première fois qu'il existe dans ces cellules tumorales une augmentation de l'expression du gène *SPHK1* qui code pour la SK1 et à l'inverse une diminution de l'expression de *SGPL1* codant pour la S1P lyase. Cette tendance a été confirmée par l'analyse de l'expression protéique par western blot ainsi que par un marquage immunohistochimique de la SK1 sur des coupes de peau où les lésions mélanomateuses présentaient une surexpression de cette enzyme comparées aux zones saines. Ces observations sont en accord avec les données de littérature qui décrivent une expression accrue de la SK1 dans les leucémies, les lymphomes et diverses tumeurs solides (Leong et Saba, 2010) et à l'opposé une expression diminuée de la S1P lyase rapportée dans des tumeurs intestinales (Oskouian *et al.*, 2005). Les variations d'expression que nous décrivons dans le mélanome sont en faveur d'une accumulation de S1P dans les cellules néoplasiques, un lysophospholipide connu pour favoriser le développement tumoral et dont les taux intracellulaires élevés confèrent une résistance à l'apoptose (Bektas *et al.*, 2005).

Les lignées que nous avons utilisées présentent des altérations génétiques fréquemment rencontrées dans ce type de tumeur. Ces lignées, issues de stades invasifs ou métastatiques, présentent des mutations monogéniques de *NRAS* ou *BRAF* ou des mutations affectant à la fois *BRAF* et *PTEN*. Dans le mélanome, ces voies sont généralement associées à une progression tumorale rapide et un faible taux de survie (Ibrahim and Haluska, 2009). Nous décrivons que ces mutations s'accompagnent d'altérations de l'expression des enzymes du métabolisme de la S1P, suggérant qu'il pourrait exister une étroite régulation de la production de S1P dans les cellules de mélanome afin de maintenir un taux constant de S1P. Cependant, pour pouvoir valider cette hypothèse, il faudrait d'une part mesurer l'activité des autres enzymes du métabolisme de la S1P, la sphingosine kinase 2 et les S1P phosphatases, et d'autre part doser par spectrométrie de masse les taux intracellulaires de S1P dans l'ensemble des lignées de mélanome.

Afin de compléter nos résultats concernant l'expression de la SK1 et de la S1P lyase dans le mélanome, nous utiliserons diverses lignées mutées ou non pour NRas, BRaf et PTEN (Wistar Collection of melanoma cell lines, collaboration Pr M. Herlyn, Philadelphia). Parallèlement, une étude moléculaire sera menée à partir d'échantillons cryoconservés, pathologiques ou non, de patients atteints de mélanome (tumorotheque, Institut Claudius

Regaud). Nous déterminerons par séquençage le statut de *NRAS*, *BRAF* et *PTEN*, avant de mener une étude transcriptomique par RT-PCR quantitative sur les gènes *SPHK1* et *SGPL1*. L'étude immunohistochimique de l'expression de la SK1 et S1P lyase sur des coupes de peau sera également complétée au cours de ce travail.

- Rôle de la S1P dans l'oncogenèse et la progression du mélanome cutané

Au cours de ce travail, nous avons montré que la variation d'expression de la SK1 dans des mélanocytes ou des cellules de mélanome modifiait la migration de celles-ci. Lorsque SK1 est surexprimée, la S1P peut s'accumuler dans la cellule ou bien être sécrétée dans le milieu extracellulaire pour agir de façon autocrine ou paracrine via les S1PRs. Notre travail semble montrer que la S1P formée puis sécrétée par des cellules de mélanome favorise leur migration et que cet effet est récepteur-dépendant puisque l'ajout d'un antagoniste des récepteurs à la S1P reverse l'effet pro-migratoire de la S1P. Dans la littérature, il est décrit que les récepteurs de la S1P régulent différemment la migration cellulaire : les récepteurs S1P1 et S1P3 favorisent ce processus alors que le récepteur S1P2 inhibe le phénomène migratoire (Anliker and Chun, 2004)(Ishii *et al.*, 2001). La S1P pourrait réguler non seulement la croissance des cellules tumorales mais aussi la migration de celles-ci et donc le développement de métastases. La mobilité et l'invasion des cellules tumorales pourraient donc être inhibées ou stimulées par la S1P selon le type de S1PR exprimé par les cellules. Notre travail mérite cependant d'être complété. Ayant montré que les récepteurs S1P1, S1P2 et S1P3 s'expriment à la surface des cellules de mélanome, il serait intéressant de bloquer spécifiquement un type de récepteurs S1PRs afin de mieux comprendre le rôle de chacun d'eux dans la migration cellulaire. L'équipe de Spiegel ayant récemment démontré le rôle des transporteurs ABCC1 et ABCG2 dans l'efflux de la S1P hors de la cellule de cancer du sein (Takabe *et al.*, 2010), nous pourrions également nous pencher sur l'étude des mécanismes mis en jeu dans la sécrétion du lysophospholipide par la cellule de mélanome en ciblant plus particulièrement les transporteurs de type ABC.

Etant donné que la SK1 est une kinase oncogénique (Xia *et al.*, 2000) et qu'à l'inverse, l'équipe vient de montrer que le déficit en S1P lyase pouvait induire une transformation cellulaire ainsi que la formation de tumeurs chez la souris (Colié *et al.*, 2009), notre travail se concentrera ensuite sur le rôle des enzymes du métabolisme de la S1P dans l'oncogenèse tumorale. De plus, l'association des mutations Braf V600E et PTEN semble nécessaire à la transformation des mélanocytes et au développement de mélanomes invasif et métastatique

chez la souris (Dankort et *al.*, 2009). Grâce aux outils moléculaires dont nous disposons, nous évaluerons donc la capacité des enzymes qui contrôlent la production de S1P à transformer des mélanocytes sains en mélanome métastatique en fonction du statut de BRAf et de PTEN. Nous associerons dans des mélanocytes ces différents événements mutationnels (exemple : surexpression de la SK1 associée à la mutation BRAf V600E) et nous caractériserons la transformation de ces cellules en :

- 1- évaluant leur capacité à proliférer et migrer par la technique du test à la cicatrice,
- 2- vérifiant que ces cellules forment des colonies en agar,
- 3- caractérisant la transition épithélio-mésenchymateuse. L'expression de marqueurs épithéliaux (E-cadhérine) et mésenchymateux (N-cadhérine, vimentine, fibronectine) sera plus particulièrement analysée. En effet, des travaux récents ont décrit l'implication de glycosphingolipides dans la transition épithélio-mésenchymateuse de cellules murines et humaines de glande mammaire (Guan et *al.*, 2009) mais à ce jour, le rôle de la S1P dans cette étape clé de la tumorigenèse reste totalement inconnu.
- 4- en analysant l'expression de MITF. MITF est un facteur de transcription qui régule la pigmentation, la prolifération et la survie des mélanocytes et dont le taux est diminué dans le mélanome. Il sera important d'étudier son expression pour deux raisons : 1- BRAf phosphoryle ce facteur de transcription ce qui entraîne sa dégradation et stimule la prolifération cellulaire (Wellbrock et *al.*, 2008) et 2- l'addition de S1P exogène à des mélanocytes sains inhibe la synthèse de mélanine via l'activation des MAPKs et la dégradation de MITF (Kim et *al.* 2003).

Ces approches *in vitro* seront complétées en étudiant *in vivo* la croissance tumorale après injection des cellules transformées chez la souris nude. La taille des tumeurs, l'angiogenèse et la formation des métastases seront mesurées.

Finalement, afin de se rapprocher au mieux de la physiologie humaine, une approche *in vitro* reposant sur des systèmes de peau humaine reconstruite sera mise à profit. Ce modèle consiste à reconstruire de la peau humaine à partir de cellules humaines en culture et d'éléments matriciels. En introduisant dans ce modèle des mélanocytes transformés, nous étudierons les effets capables de modifier l'organisation du cytosquelette, l'adhésion et la migration des cellules primaires grâce aux interactions établies entre les cellules tumorales, les kératinocytes et les fibroblastes.

- Rôle de la S1P dans la chimiorésistance du mélanome cutané

La particularité du mélanome cutané est sa grande résistance à la radiothérapie et la chimiothérapie. Un des objectifs de ce travail était d'explorer l'implication des enzymes qui régulent la production de S1P dans les phénomènes de résistance du mélanome aux molécules anticancéreuses utilisées en routine. Les résultats préliminaires que nous avons présentés révèlent que l'inhibition de la SK1 affecte la résistance des cellules au traitement par la Dacarbazine en faveur d'une moindre résistance quand SK1 est inhibée. A l'inverse, la surexpression de SK1 dans des cellules de mélanome a conduit à une résistance accrue des cellules à l'apoptose induite par le DTIC, en comparaison avec des cellules contrôles.

La résistance des cellules de mélanome à la Dacarbazine est également associée à une forte expression de Bcl-2, protéine anti-apoptotique, et à une absence de clivage de la caspase-3 effectrice tout particulièrement dans les cellules doublement mutées pour BRAf et PTEN (résultats non montrés). Or les effets anti-apoptotiques de la SK1 dans les cellules endothéliales ont été associés à une augmentation de l'expression de Bcl-2 par un mécanisme dépendant d'Akt (Limaye et *al.*, 2005). Les mêmes observations ont été faites pour Mcl-1 dans des cellules leucémiques myéloïdes (Li et *al.*, 2007). De plus il a été montré que, tandis qu'une surexpression de la SK1 induit une augmentation de Bcl-xl dans des cellules endothéliales en condition de carence en sérum (Gamble et *al.*, 2009), à l'inverse une inhibition pharmacologique de cette enzyme par la N,N-diméthyl-phytosphingosine s'accompagne d'une diminution de l'expression de Bcl-2, Bcl-xl et Mcl-1 dans des cellules leucémiques humaines HL-60 et entraîne la mort de ces cellules (Kim et *al.*, 2009). Nos résultats devront donc être complétés en vue de caractériser le type de mort cellulaire dans les cellules de mélanome et mieux comprendre les interactions moléculaires entre les membres de la famille Bcl-2 et les enzymes qui régulent le taux de S1P.

A partir des outils cellulaires dont nous disposons, nous appliquerons sur les cellules un traitement par un agent cytotoxique puis nous étudierons leur réponse à l'apoptose en :

- 1- procédant à une analyse morphologique des cellules en présence d'un agent intercalant de l'ADN,
- 2- analysant l'externalisation des phosphatidylsérines en cytométrie de flux,
- 3- étudiant l'activation des caspases par dosage enzymatique ou par Western blot,
- 4- étudiant par microscopie à fluorescence le relargage du cytochrome c ,
- 5- analysant l'expression d'autres protéines antiapoptotiques de la famille de Bcl-2 comme Bcl-xl, et Mcl-1. Nous pourrons ainsi décrire plus précisément le type de mort cellulaire qui

survient lorsque les cellules sont traitées par la Dacarbazine ainsi que les interactions qui relient les protéines antiapoptotiques de la famille de Bcl-2 aux enzymes qui régulent la production de S1P et aux voies de signalisation activées par NRas, BRAf et PTEN. Parallèlement, nous continuerons d'évaluer la viabilité cellulaire au traitement par la Dacarbazine en élargissant le panel de molécules anticancéreuses. La résistance à la chimiothérapie pourra aussi être évaluée sur les modèles *in vitro* de peau reconstituée.

- Mécanismes moléculaires qui relient la production de S1P aux voies de signalisation induites par NRas, BRAf, CRAf et PTEN

Afin de comprendre l'influence de la S1P ou des enzymes qui régulent sa production sur les voies classiquement activées dans le mélanome, nous avons utilisé une stratégie antisens. L'utilisation d'un siRNA dirigé contre BRAf dans une lignée exprimant la forme oncogénique de cette kinase a conduit à une diminution de l'expression de la SK1 ainsi que de l'activation de la voie des MAPKs. Réciproquement la surexpression de la kinase BRAf et tout particulièrement de sa forme mutée en V600E, qui rend l'enzyme active de façon constitutive, s'est traduite par une augmentation de la phosphorylation des MAPKs ainsi que de l'expression de la SK1. Bien qu'il n'existe aucune donnée bibliographique reliant BRAf et SK1, certains travaux montrent que les voies impliquant Ras et la S1P s'autorégulent. Ras est une protéine de la famille des protéines G monomériques, activées par les récepteurs des facteurs de croissance qui agit très en amont dans l'activation des voies de prolifération notamment par phosphorylation de BRAf dans le mélanome (Smalley, 2010). Il a été rapporté que l'activité transformante de Ras dans des fibrosarcomes repose sur la présence de mutations dans le gène codant pour cette protéine mais aussi sur l'activation de SK1. Ainsi, la présence d'une SK1 inactive diminue fortement les propriétés oncogéniques de Ras (Xia et al., 2000). Cependant, d'autres études ont montré en utilisant soit le dominant négatif de RasN17 (Miura et al., 2003) soit des siRNAs dirigés contre la SK1 (Shu et al., 2002) que la S1P agirait en amont de Ras/Raf1. Enfin, dans des cellules NIH3T3, la SK1 activerait Raf1 après stimulation par Ras et PI3K (Lee et Han, 2002). Nos résultats indiquent que dans les cellules de mélanome, BRAf semble réguler SK1 et cette régulation est dépendante des MAPKs (Figure 24). Il reste maintenant à comprendre, par des approches génétiques ou pharmacologiques, si cette interaction est dépendante de Ras et si, à l'inverse, l'inhibition ou la surexpression de la SK1 peut réguler l'expression de BRAf, afin de définir si l'activation de SK1 est une cause ou une conséquence de l'activation de la voie Ras/Raf/MEK/ERK.

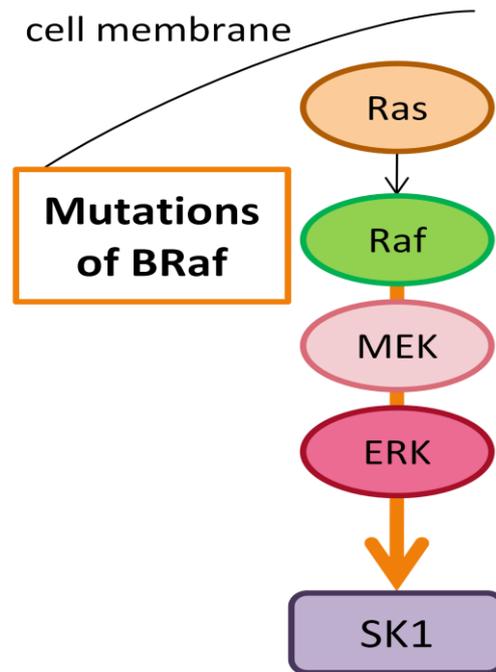


Figure 24 Proposition schématique de l'activation de SK1 par Braf médiée par les MAPKs

Pour approfondir cette étude, nous analyserons le rôle de PTEN sur la régulation de l'expression des enzymes du métabolisme de la S1P. Une étude préliminaire réalisée au sein de notre laboratoire a montré que l'inhibition de PTEN dans des cellules de mélanome qui expriment la forme sauvage de la phosphatase conduisait à la surexpression de la SK1 suggérant que cette stimulation est sans doute la conséquence directe de l'activation de la voie de la PI3K/Akt puisque cette voie est connue pour réguler la formation de S1P (Francy *et al.*, 2007). D'autres travaux réalisés dans l'équipe ont montré que l'état de phosphorylation de PTEN pouvait être modulé par le niveau d'expression de la S1P lyase (résultats non publiés). Ainsi, dans des cellules totalement invalidées pour cette enzyme, PTEN est phosphorylée et inactive, ce qui pourrait favoriser l'activation de voies impliquées dans la survie cellulaire. PTEN et S1P lyase sont toutes deux des enzymes agissant sur des substrats lipidiques phosphorylés. Ces derniers, respectivement PIP3 et S1P, sont connus pour activer la protéine Akt. D'autres travaux seront donc nécessaires afin de définir les mécanismes moléculaires mis en jeu entre ces deux voies. Pour cela, nous avons à disposition un plasmide qui code pour la protéine PTEN sauvage ainsi qu'un autre pour une forme mutée et inactive.

Dans ce travail, nous avons utilisé une approche génétique (siRNA) et pharmacologique pour comprendre le rôle exact des protéines Braf et SK1 dans la signalisation cellulaire et la migration du mélanome. L'analyse de ces interactions pourrait

être complétée par l'utilisation d'autres agents pharmacologiques. En effet, il existe à l'heure actuelle un large choix de molécules telles que des inhibiteurs de la S1P lyase (2-vinyl dihydrosphingosine-1-phosphate ou THI), mais aussi l'inhibiteur spécifique de BRAf V600E (Sorafenib ou PLX4032) ou des inhibiteurs de la PI3K/Akt (Pérfosine). Enfin, à l'aide de vecteurs lentiviraux permettant de transduire efficacement les cellules de mélanome, nous génèrerons des modèles de cellules tumorales dans lesquelles la production de S1P sera induite ou réprimée (shRNA) de manière contrôlée.

L'ensemble de ces outils nous permettra d'étudier les mécanismes moléculaires qui relient la S1P aux voies de signalisation induites par NRas, BRAf et PTEN. Nous nous intéresserons également à CRAf car cette kinase, qui se dimérise avec BRAf après activation par Ras, a récemment fait l'objet d'une étude qui montrait que son inhibition conduit à l'apoptose de cellules de mélanome non mutées pour BRAf (Smalley et *al.*, 2009).

Ce travail constitue un premier pas vers la compréhension du rôle de la S1P dans la physiopathologie du mélanome et la résistance aux thérapies actuelles. Un objectif de l'étude du rôle de la S1P dans la genèse et la progression du mélanome sera le développement de modèles précliniques dans lesquels la délétion des gènes régulateurs du taux de S1P sera ciblée dans les mélanocytes et combinée à des altérations de BRAf ou PTEN ainsi que la mise en place de tests évaluant l'effet thérapeutique du ciblage de la S1P afin de fournir au thérapeute de nouveaux biomarqueurs. A long terme, le deuxième objectif sera la mise au point de traitements ciblant le métabolisme de la S1P et pouvant être associés à d'autres molécules pharmacologiques. Une étude a d'ores et déjà montré que l'injection de nanoliposomes de céramide, un métabolite cytotoxique de la S1P, conjointement avec du sorafenib, un inhibiteur multikinase, à des souris xénotransplantées avec différentes tumeurs potentialisait les effets inhibiteurs du sorafenib seul sur la croissance tumorale (Tran et *al.*, 2008).

BIBLIOGRAPHIE

- Ackermann J**, Frutschi M, Kaloulis K, McKee T, Trumpp A, Beermann F. Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res.* 2005;65:4005–11.
- Ahmad M**, Long JS, Pyne NJ, Pyne S. The effect of hypoxia on lipid phosphate receptor and sphingosine kinase expression and mitogen-activated protein kinase signaling in human pulmonary smooth muscle cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2006;79(3-4):278-86.
- Akao Y**, Banno Y, Nakagawa Y, Hasegawa N, Kim TJ, Murate T, Igarashi Y, Nozawa Y. High expression of sphingosine kinase 1 and S1P receptors in chemotherapy-resistant prostate cancer PC3 cells and their camptothecin-induced up-regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 342(4):1284-90.
- Alemanly R**, Kleuser B, Ruwisch L, Danneberg K, Lass H, Hashemi R, Spiegel S, Jakobs KH, Meyer zu Heringdorf D. Depolarisation induces rapid and transient formation of intracellular sphingosine-1-phosphate. *FEBS Lett.* 2001; 509(2):239-44.
- Algazi AP**, Soon CW, Daud AI. Treatment of cutaneous melanoma: current approaches and future prospects. *Cancer Manag Res.* 2010;2:197-211.
- Allende ML**, Dreier JL, Mandala S, Proia RL. Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. *J Biol Chem.* 2004;279(15):15396-401.
- Alvarez SE**, Harikumar KB, Hait NC, Allegood J, Strub GM, Kim EY, Maceyka M, Jiang H, Luo C, Kordula T, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature.* 2010 Jun 24;465(7301):1084-8.
- American Joint Committee on Cancer, Balch CM**, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2001;19(16):3635-48.
- Anelli V**, Gault CR, Cheng AB, Obeid LM. Sphingosine kinase 1 is up-regulated during hypoxia in U87MG glioma cells. Role of hypoxia-inducible factors 1 and 2. *J Biol Chem.* 2008;283(6):3365-75.
- Anliker B**, Chun J. Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. *Semin Cell Dev Biol.* 2004;15(5):457-65.
- Antoon JW**, White MD, Meacham WD, Slaughter EM, Muir SE, Elliott S, Rhodes LV, Ashe HB, Wiese TE, Smith CD, Burow ME, Beckman BS. Antiestrogenic effects of the novel sphingosine kinase-2 inhibitor ABC294640. *Endocrinology.* 2010;151(11):5124-35.
- Arikawa K**, Takuwa N, Yamaguchi H, Sugimoto N, Kitayama J, Nagawa H, Takehara K, Takuwa Y. Ligand-dependent inhibition of B16 melanoma cell migration and invasion via endogenous S1P2 G protein-coupled receptor. Requirement of inhibition of cellular RAC activity. *J Biol Chem.* 2003;278(35):32841-51.
- Azuma H**, Takahara S, Horie S, Muto S, Otsuki Y, Katsuoka Y. Induction of apoptosis in human bladder cancer cells in vitro and in vivo caused by FTY720 treatment. *J Urol.* 2003;169(6):2372-7.
- Balch CM**, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. New TNM melanoma staging system: linking biology and natural history to clinical outcomes. *Semin Surg Oncol.* 2003;21(1):43-52.
- Balthasar S**, Samulin J, Ahlgren H, Bergelin N, Lundqvist M, Toescu EC, Eggo MC, Törnquist K. Sphingosine 1-phosphate receptor expression profile and regulation of migration in human thyroid cancer cells. *Biochem J.* 2006;398(3):547-56.
- Bandhuvula P, Saba JD**. Sphingosine-1-phosphate lyase in immunity and cancer: silencing the siren. *Trends Mol Med.* 2007;13(5):210-7.
- Bedia C**, Camacho L, Abad JL, Fabriàs G, Levade T. A simple fluorogenic method for determination of acid ceramidase activity and diagnosis of Farber disease. *J Lipid Res.* 2010;51(12):3542-7.
- Bedikian AY**, Millward M, Pehamberger H, Conry R, Gore M, Trefzer U, Pavlick AC, DeConti R, Hersh EM, Hersey P, Kirkwood JM, Haluska FG; Oblimersen Melanoma Study Group. Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol.* 2006;24(29):4738-45.

- Bektas M**, Jolly PS, Müller C, Eberle J, Spiegel S, Geilen CC. Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression. *Oncogene*. 2005;24:178-87.
- Beljanski V**, Knaak C, Smith CD. A novel sphingosine kinase inhibitor induces autophagy in tumor cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;333(2):454-64.
- Benjamin CL**, Melnikova VO, Ananthaswamy HN. Models and mechanisms in malignant melanoma. *Mol Carcinog*. 2007;46(8):671-78.
- Birklé S**, Zeng G, Gao L, Yu RK, Aubry J. Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie*. 2003;85(3-4):455-63.
- Bonhoure E**, Pchejetski D, Aouali N, Morjani H, Levade T, Kohama T, Cuvillier O. Overcoming MDR-associated chemoresistance in HL-60 acute myeloid leukemia cells by targeting sphingosine kinase-1. *Leukemia*. 2006;20(1):95-102.
- Box NF**, Duffy DL, Chen W, Stark M, Martin NG, Sturm RA, Hayward NK. MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations. *Am J Hum Genet*. 2001;69(4):765-73.
- Boudker O**, Futerman AH. Detection and characterization of ceramide-1-phosphate phosphatase activity in rat liver plasma membrane. *J Biol Chem*. 1993;268(29):22150-5.
- Brinkmann V**, Davis MD, Heise CE, Albert R, Cottens S, Hof R, Bruns C, Prieschl E, Baumruker T, Hiestand P, Foster CA, Zollinger M, Lynch KR. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem*. 2002;277(24):21453-7.
- Carvajal RD**, Chapman PB, Wolchok JD, Cane L, Teitcher JB, Lutzky J, Pavlick AC, Bastian BC, Antonescu CR, Schwartz GK. A phase II study of imatinib mesylate (IM) for patients with advanced melanoma harboring somatic alterations of *KIT*. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)*. 2009;27(15s):Suppl; abstr 9001.
- Chae SS**, Paik JH, Furneaux H, Hla T. Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference. *J Clin Invest*. 2004;114(8):1082-9.
- Chen WV**. Identification and validation of PDGF transcriptional targets by microarray-coupled gene-trap mutagenesis. *Nat. Genet*. 2004;36, 304–312.
- Chi H, Flavell RA**. Cutting edge: regulation of T cell trafficking and primary immune responses by sphingosine 1-phosphate receptor 1. *J Immunol*. 2005;174(5):2485-8.
- Chudnovsky Y**, Adams AE, Robbins PB, Lin Q, Khavari PA. Use of human tissue to assess the oncogenic activity of melanoma-associated mutations. *Nat Genet*. 2005;37(7):745-49.
- Clinical Trials.gov**. A study of RO5185426 in comparison with dacarbazine in previously untreated patients with metastatic melanoma. Disponible sur : <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01006980?term=RO5185426&rank=3>
- Colié S**, Van Veldhoven PP, Kedjouar B, Bedia C, Albinet V, Sorli SC, Garcia V, Djavaheri-Mergny M, Bauvy C, Codogno P, Levade T, Andrieu-Abadie N. Disruption of sphingosine 1-phosphate lyase confers resistance to chemotherapy and promotes oncogenesis through Bcl-2/Bcl-xL upregulation. *Cancer Res*. 2009;69(24):9346-53.
- Collisson EA**, De A, Suzuki H, Gambhir SS, Kolodney MS. Treatment of metastatic melanoma with an orally available inhibitor of the Ras-Raf-MAPK cascade. *Cancer Res*. 2003;63(18):5669-73.
- Cornett WR**, McCall LM, Petersen RP, Ross MI, Briele HA, Noyes RD, Sussman JJ, Kraybill WG, Kane JM 3rd, Alexander HR, Lee JE, Mansfield PF, Pingpank JF, Winchester DJ, White RL Jr, Chadaram V, Herndon JE 2nd, Fraker DL, Tyler DS; American College of Surgeons Oncology Group Trial Z0020. Randomized multicenter trial of hyperthermic isolated limb perfusion with melphalan alone compared with melphalan plus tumor necrosis factor: American College of Surgeons Oncology Group Trial Z0020. *J Clin Oncol*. 2006; 24(25):4196-201.
- Coussin F**, Scott RH, Wise A, Nixon GF. Comparison of sphingosine 1-phosphate-induced intracellular signaling pathways in vascular smooth muscles: differential role in vasoconstriction. *Circ Res*. 2002;91(2):151-7
- Crickx B**. Histologie et Histopathologie de la Peau et de ses Annexes. *Ann Dermatol Venereol*. 2005;132:8S5-48.
- Cuvillier O**, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, Spiegel S. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*. 1996;381: 800–803.

- Dankort D**, Curley DP, Cartlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky WE Jr, You MJ, DePinho RA, McMahon M, Bosenberg M.. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet.* 2009; 41:544–552.
- Davies H**, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417(6892):949–54.
- Döll F**, Pfeilschifter J, Huwiler A. The epidermal growth factor stimulates sphingosine kinase-1 expression and activity in the human mammary carcinoma cell line MCF7. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1738(1-3):72-81.
- Flaherty K**, Puzanov I, Sosman J, Kim K, Ribas A, McArthur G, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman P. Phase I study of PLX4032: Proof of concept for V600E BRAF mutation as a therapeutic target in human cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(15s (Supplement; abstract 9000)).
- Forrest M**, Sun SY, Hajdu R, Bergstrom J, Card D, Doherty G, Hale J, Keohane C, Meyers C, Milligan J. Immune cell regulation and cardiovascular effects of sphingosine 1-phosphate receptor agonists in rodents are mediated via distinct receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309:758–768.
- Francy JM**, Nag A, Conroy EJ, Hengst JA, Yun JK. Sphingosine kinase 1 expression is regulated by signaling through PI3K, AKT2, and mTOR in human coronary artery smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1769(4):253-65.
- French KJ**, Schrecengost RS, Lee BD, Zhuang Y, Smith SN, Eberly JL, Yun JK, Smith CD. Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Res.* 2003;63(18):5962-9.
- Friedman RJ**, Rigel DS, Kopf AW. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA Cancer J Clin.* 1985;35:130-51.
- Fukuda Y**, Kihara A, Igarashi Y. Distribution of sphingosine kinase activity in mouse tissues: contribution of SPHK1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;309(1):155-60.
- Futerman AH**, Hannun YA. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* 2004;5(8):777-82
- Gamble JR**, Sun WY, Li X, Hahn CN, Pitson SM, Vadas MA, Bonder CS. Sphingosine kinase-1 associates with integrin alpha V beta 3 to mediate endothelial cell survival. *Am J Pathol.* 2009;175(5):2217-25.
- Gandini S**, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer.* 2005;41(14):2040-59.
- Garcia-Barros M**, Lacorazza D, Petrie H, Haimovitz-Friedman A, Cardon-Cardo C, Nimer S, Fuks Z, Kolesnick R. Host acid sphingomyelinase regulates microvascular function not tumor immunity. *Cancer Res.* 2004;64(22):8285-91.
- Garnett MJ**, Rana S, Paterson H, Barford D, Marais R. Wild-type and mutant B-RAF activate C-RAF through distinct mechanisms involving heterodimerization. *Mol Cell.* 2005;20(6):963-9.
- Garraway LA**, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, Beroukhi R, Milner DA, Granter SR, Du J, Lee C, Wagner SN, Li C, Golub TR, Rimm DL, Meyerson ML, Fisher DE, Sellers WR. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature.* 2005;436(7047):117-22.
- Gault CR**, Obeid LM, Hannun YA. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp Med Biol.* 2010;688:1-23.
- Ghosh TK, Bian J, Gill DL. Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium. *J Biol Chem.* 1994; 269(36):22628-35.
- Ghosh P**, Chin L. Genetics and Genomics of Melanoma. *Expert Rev Dermatol.* 2009; 4(2): 131.
- Goel VK**, Ibrahim N, Jiang G, Singhal M, Fee S, Flotte T, Westmoreland S, Haluska FS, Hinds PW, Haluska FG. Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. *Oncogene.* 2009; 28(23):2289-98.
- Gray-Schopfer V**, Wellbrock C, Marais R. Melanoma Biology and New Targeted Therapy. *Nature.* 2007;445:851-57.

- Green DS**, Bodman-Smith MD, Dalgleish AG, Fischer MD. Phase I/II study of topical imiquimod and intralesional interleukin-2 in the treatment of accessible metastases in malignant melanoma. *Br J Dermatol.*2007;156(2):337–345.
- Greene VR**, Johnson MM, Grimm EA, Ellerhorst JA. Frequencies of NRAS and BRAF mutations increase from the radial to the vertical growth phase in cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2009;129(6):1483-88.
- Gremel G**, Rafferty M, Lau TYK, Gallagher WM. Identification and Functional Validation of Therapeutic Targets for Malignant Melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2009;72:194-214.
- Grey A**, Xu X, Hill B, Watson M, Callon K, Reid IR, Cornish J. Osteoblastic cells express phospholipid receptors and phosphatases and proliferate in response to sphingosine-1-phosphate. *Calcif Tissue Int.* 2004; 74(6):542-50.
- Guan F**, Handa K, Hakomori SI. Specific glycosphingolipids mediate epithelial-to-mesenchymal transition of human and mouse epithelial cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106:7461-6.
- Guillermet-Guibert J**, Davenne L, Pchejetski D, Saint-Laurent N, Brizuela L, Guilbeau-Frugier C, Delisle MB, Cuvillier O, Susini C, Bousquet C. Targeting the sphingolipid metabolism to defeat pancreatic cancer cell resistance to the chemotherapeutic gemcitabine drug. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(4):809-20.
- Hacker E**, Muller HK, Irwin N, Gabrielli B, Lincoln D, Pavey S, Powell MB, Malumbres M, Barbacid M, Hayward N, Walker G. Spontaneous and UV radiation-induced multiple metastatic melanomas in Cdk4R24C/R24C/TPras mice. *Cancer Res.* 2006;66(6):2946-52.
- Hait NC**, Sarkar S, Le Stunff H, Mikami A, Maceyka M, Milstien S, Spiegel S. Role of sphingosine kinase 2 in cell migration toward epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 2005;280(33):29462-9.
- Hait NC**, Bellamy A, Milstien S, Kordula T, Spiegel S. Sphingosine kinase type 2 activation by ERK-mediated phosphorylation. *J Biol Chem.* 2007;282(16):12058-65.
- Hait NC**, Allegood J, Maceyka M, Strub GM, Harikumar KB, Singh SK, Luo C, Marmorstein R, Kordula T, Milstien S, Spiegel S. Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science.* 2009; 325(5945):1254-7.
- Halaban R**, Zhang W, Bacchiocchi A, Cheng E, Parisi F, Ariyan S, Krauthammer M, McCusker JP, Kluger Y, Sznol M. PLX4032, a selective BRAF(V600E) kinase inhibitor, activates the ERK pathway and enhances cell migration and proliferation of BRAF melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010;23(2):190-200.
- Hamid O**, Chin K, Li J, et al. Dose effect of ipilimumab in patients with advanced melanoma: Results from a phase II, randomized, dose-ranging study. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts).* 2008;26(May 20 Suppl):abstr 9025.
- Hanada K**, Kumagai K, Tomishige N, Kawano M. CERT and intracellular trafficking of ceramide. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1771(6):644-53
- Hänel P**, Andréani P, Gräler MH. Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB J.* 2007; 21(4):1202-9.
- Harris SL**, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene.* 2005 ;24(17):2899-908.
- Haute Autorité de Santé.** Stratégie de Diagnostic Précoce du Mélanome. 2006.
- Henderson M**, Burmeister B, Thompson J. Adjuvant radiotherapy and regional lymph node field control in melanoma patients after lymphadenectomy: Results of an intergroup randomized trial (ANZMTG 01.02/TROG 02.01). *J Clin Oncol (Meeting Abstracts).* 2009;27(18s):Suppl; abstr LBA9084.
- Herman P**, Machado MAC, Montagnini AL D'Albuquerque LA, Saad WA, Machado MC. Selected patients with metastatic melanoma may benefit from liver resection. *World J Surg.* 2007;31(1):171–174.
- Hill GJ**, Kremenz ET, Hill HZ. Dimethyl triazeno imidazole carboxamide and combination therapy for melanoma. IV.Late results after complete response to chemotherapy (Central Oncology Group protocols 7130, 7131, and 7131A). *Cancer.* 1984;53(6):1299–1305.
- Hirschberg CB**, Kistic A, Schroepfer GJ. Enzymatic formation of dihydrosphingosine 1-phosphate. *J. Biol. Chem.* 1970;245:3084-3090.

- Hla T.** Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate. *Semin Cell Dev Biol.* 2004;15(5):513-20.
- Hla T, Venkataraman K, Michaud J.** The vascular S1P gradient-cellular sources and biological significance. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1781(9):477-82.
- Holland EA, Schmid H, Kefford RF, Mann GJ.** CDKN2A (P16(INK4a)) and CDK4 mutation analysis in 131 Australian melanoma probands: effect of family history and multiple primary melanomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 1999;25(4):339-48.
- Hwang PH, Yi HK, Kim DS, Nam SY, Kim JS, Lee DY.** Suppression of tumorigenicity and metastasis in B16F10 cells by *PTEN/MMAC1/TEP1* gene. *Cancer Lett.* 2001;172:83-91.
- Ibrahim N, Haluska FG.** Molecular Pathogenesis of Cutaneous Melanocytic Neoplasms. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2009; 4:551-79.
- Igarashi J, Erwin PA, Dantas AP, Chen H, Michel T.** VEGF induces S1P1 receptors in endothelial cells: Implications for cross-talk between sphingolipid and growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(19):10664-9.
- Inagaki Y, Li PY, Wada A, Mitsutake S, Igarashi Y.** Identification of functional nuclear export sequences in human sphingosine kinase 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;311(1):168-73.
- Inoue-Narita T, Hamada K, Sasaki T, Hatakeyama S, Fujita S, Kawahara K, Sasaki M, Kishimoto H, Eguchi S, Kojima I, Beermann F, Kimura T, Osawa M, Itami S, Mak TW, Nakano T, Manabe M, Suzuki A.** Pten deficiency in melanocytes results in resistance to hair graying and susceptibility to carcinogen-induced melanomagenesis. *Cancer Res.* 2008;68(14):5760-68.
- Ishii I, Friedman B, Ye X, Kawamura S, McGiffert C, Contos JJ, Kingsbury MA, Zhang G, Brown JH, Chun J.** Selective loss of sphingosine 1-phosphate signaling with no obvious phenotypic abnormality in mice lacking its G protein-coupled receptor, LP(B3)/EDG-3. *J Biol Chem.* 2001;276(36): 33697-704.
- Jaillard C, Harrison S, Stankoff B, Aigrot MS, Calver AR, Duddy G, Walsh FS, Pangalos MN, Arimura N, Kaibuchi K, Zalc B, Lubetzki C.** Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *J Neurosci.* 2005; 25(6):1459-69.
- Johnson KR., Becker, K.P., Facchinetti, M.M., Hannun, Y.A. and Obeid, L.M.** PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. Extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 35257-262.
- Johnson KR, Johnson KY, Becker KP, Bielawski J, Mao C, Obeid LM.** Role of human sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 in the regulation of intra- and extracellular sphingosine-1-phosphate levels and cell viability. *J Biol Chem.* 2003;278(36):34541-7.
- Johnson KR, Johnson KY, Crellin HG, Ogretmen B, Boylan AM, Harley RA, Obeid LM.** Immunohistochemical distribution of sphingosine kinase 1 in normal and tumor lung tissue. *J Histochem Cytochem.* 2005;53(9):1159-66.
- Karasarides M, Chiloeches A, Hayward R, Niculescu-Duvaz D, Scanlon I, Friedlos F, Ogilvie L, Hedley D, Martin J, Marshall CJ, Springer CJ, Marais R.** B-RAF is a therapeutic target in melanoma. *Oncogene.* 2004;23(37):6292-98.
- Kawamori T, Osta W, Johnson KR, Pettus BJ, Bielawski J, Tanaka T, Wargovich MJ, Reddy BS, Hannun YA, Obeid LM, Zhou D.** Sphingosine kinase 1 is up-regulated in colon carcinogenesis. *FASEB J.* 2006;20(2):386-8.
- Khavari PA.** Modelling cancer in human skin tissue. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(4):270-80.
- Kim BM, Choi YJ, Han Y, Yun YS, Hong SH.** N,N-dimethyl phytosphingosine induces caspase-8-dependent cytochrome c release and apoptosis through ROS generation in human leukemia cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 239(1):87-97.
- Kim DS, Hwang ES, Lee JE, Kim SY, Kwon SB, Park KC.** Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation. *J Cell Sci.* 2003; 116:1699-706.

- Kimura T**, Watanabe T, Sato K, Kon J, Tomura H, Tamama K, Kuwabara A, Kanda T, Kobayashi I, Ohta H, Ui M, Okajima F. Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *Biochem J*. 2000; 348(1):71-6.
- Kolch W**. To be or not to be : a question of B-Raf?. *Trends Neurosci*. 2001;24(9):498-500.
- Kohno M**, Momoi M, Oo ML, Paik JH, Lee YM, Venkataraman K, Ai Y, Ristimaki AP, Fyrst H, Sano H, Rosenberg D, Saba JD, Proia RL, Hla T. Intracellular role for sphingosine kinase 1 in intestinal adenoma cell proliferation. *Mol Cell Biol*. 2006;26(19):7211-23.
- Kono M**, Mi Y, Liu Y, Sasaki T, Allende ML, Wu YP, Yamashita T, Proia RL. The sphingosine-1-phosphate receptors S1P1, S1P2, and S1P3 function coordinately during embryonic angiogenesis. *J Biol Chem*. 2004;279(28):29367-73.
- LaMontagne K**, Littlewood-Evans A, Schnell C, O'Reilly T, Wyder L, Sanchez T, Probst B, Butler J, Wood A, Liau G, Billy E, Theuer A, Hla T, Wood J. Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization. *Cancer Res*. 2006;66(1):221-31.
- Landi MT**, Bauer J, Pfeiffer RM, Elder DE, Hulley B, Minghetti P, Calista D, Kanetsky PA, Pinkel D, Bastian BC. MC1R germline variants confer risk for BRAF-mutant melanoma. *Science*. 2006;313(5786):521-22.
- Larue L**, Beermann F. Cutaneous melanoma in genetically modified animals. *Pigment Cell Res*. 2007;20(6):485-97.
- Laviad EL**, Albee L, Pankova-Kholmyansky I, Epstein S, Park H, Merrill AH Jr, Futerman AH. Characterization of ceramide synthase 2: tissue distribution, substrate specificity, and inhibition by sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem*. 2008;283(9):5677-84.
- Lazarov M**, Kubo Y, Cai T, Dajee M, Tarutani M, Lin Q, Fang M, Tao S, Green CL, Khavari PA. CDK4 coexpression with Ras generates malignant human epidermal tumorigenesis. *Nat Med*. 2002;8(10):1105-14.
- Lepley D**, Paik JH, Hla T, Ferrer F. The G protein-coupled receptor S1P2 regulates Rho/Rho kinase pathway to inhibit tumor cell migration. *Cancer Res*. 2005; 65(9):3788-95.
- Le Scolan E**, Pchejetski D, Banno Y, Denis N, Mayeux P, Vainchenker W, Levade T, Moreau-Gachelin F. Overexpression of sphingosine kinase 1 is an oncogenic event in erythroleukemic progression. *Blood*. 2005 ;106(5):1808-16.
- Le Stunff H**, Peterson C, Liu H, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate and lipid phosphohydrolases. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1582(1-3):8-17.
- Le Stunff H**, Galve-Roperh I, Peterson C, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis. *J Cell Biol*. 2002;158(6):1039-49.
- Le Stunff H**, Mikami A, Giussani P, Hobson JP, Jolly PS, Milstien S, Spiegel S. Role of sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 in epidermal growth factor-induced chemotaxis. *J Biol Chem*. 2004; 279(33):34290-7.
- Le Stunff H**, Giussani P, Maceyka M, Lépine S, Milstien S, Spiegel S. Recycling of sphingosine is regulated by the concerted actions of sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase 1 and sphingosine kinase 2. *J Biol Chem*. 2007; 282(47):34372-80.
- Lee OH**, Kim YM, Lee YM, Moon EJ, Lee DJ, Kim JH, Kim KW, Kwon YG. Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 264(3):743-50.
- Lee M, Han SS**. Choline phosphate potentiates sphingosine-1-phosphate-induced Raf-1 kinase activation dependent of Ras--phosphatidylinositol-3-kinase pathway. *Cell Signal*. 2002; 14(4):373-9.
- Lee TK**, Man K, Ho JW, Wang XH, Poon RT, Xu Y, Ng KT, Chu AC, Sun CK, Ng IO, Sun HC, Tang ZY, Xu R, Fan ST. FTY720: a promising agent for treatment of metastatic hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005 ;11(23):8458-66.
- Leong WI, Saba JD**. S1P metabolism in cancer and other pathological conditions. *Biochimie*. 2010;92(6):716-23.

- Liu JW**, Sun P, Yan Q, Paller AS, Gerami P, Ho N, Vashi N, Le Poole IC, Wang XQ. De-N-acetyl GM3 promotes melanoma cell migration and invasion through urokinase plasminogen activator receptor signaling-dependent MMP-2 activation. *Cancer Res.* 2009;69(22):8662-9.
- Li QF**, Huang WR, Duan HF, Wang H, Wu CT, Wang LS. Sphingosine kinase-1 mediates BCR/ABL-induced upregulation of Mcl-1 in chronic myeloid leukemia cells. *Oncogene.* 2007; 26(57):7904-8.
- Limaye V**, Li X, Hahn C, Xia P, Berndt MC, Vadas MA, Gamble JR. Sphingosine kinase-1 enhances endothelial cell survival through a PECAM-1-dependent activation of PI-3K/Akt and regulation of Bcl-2 family members. *Blood.* 2005; 105(8):3169-77.
- Liu H**, Sugiura M, Nava VE, Edsall LC, Kono K, Poulton S, Milstien S, Kohama T, Spiegel S. Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J Biol Chem.* 2000; 275(26):19513-20.
- Liu Y**, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, Hobson JP, Rosenfeldt HM, Nava VE, Chae SS, Lee MJ, Liu CH, Hla T, Spiegel S, Proia RL. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest.* 2000;106(8):951-61.
- Long JS**, Fujiwara Y, Edwards J, Tannahill C, Tigyi G, Pyne S, Pyne NJ. Sphingosine 1-phosphate 4 uses HER2 (ErbB2) to regulate extracellular signal regulated kinase-1/2 in MDA-MB-453 breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2010a; 285, 35957–35966.
- Maceyka M**, Sankala H, Hait NC, Le Stunff H, Liu H, Toman R, Collier C, Zhang M, Satin LS, Merrill AH Jr, Milstien S, Spiegel S. SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem.* 2005;280(44):37118-29.
- Mackie RM**. Malignant melanoma: a guide to early diagnosis. Glasgow (UK): University of Glasgow. 1989.
- Matloubian M**, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature.* 2004 Jan 22;427(6972):355-60.
- Mechtcheriakova D**, Wlachos A, Sobanov J, Kopp T, Reuschel R, Bornancin F, Cai R, Zemann B, Urtz N, Stingl G, Zlabinger G, Woisetschläger M, Baumruker T, Billich A. Sphingosine 1-phosphate phosphatase 2 is induced during inflammatory responses. *Cell Signal.* 2007; 19(4):748-60.
- Michailidou C**, Jones M, Walker P, Kamarashev J, Kelly A, Hurlstone AF. Dissecting the roles of Raf- and PI3K-signalling pathways in melanoma formation and progression in a zebrafish model. *Dis Model Mech.* 2009;2(7-8):399-411.
- Michaloglou C**, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peeper DS. BRAF V600E-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature.* 2005;436(7051):720-4.
- Middleton MR**, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S, Gore M, Aamdal S, Cebon J, Coates A, Dreno B, Henz M, Schadendorf D, Kapp A, Weiss J, Fraass U, Statkevich P, Muller M, Thatcher N. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol.* 2000;18(1):158-66.
- Miura S**, Tanigawa H, Matsuo Y, Fujino M, Kawamura A, Saku K. Ras/Raf1-dependent signal in sphingosine-1-phosphate-induced tube formation in human coronary artery endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 306(4):924-9.
- Mizugishi K**, Yamashita T, Olivera A, Miller GF, Spiegel S, Proia RL. Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(24):11113-21.
- Morales A**, Lee H, Goñi FM, Kolesnick R, Fernandez-Checa JC. Sphingolipids and cell death. *Apoptosis.* 2007;12(5):923-39.
- Nakade Y**, Banno Y, T-Koizumi K, Hagiwara K, Sobue S, Koda M, Suzuki M, Kojima T, Takagi A, Asano H, Nozawa Y, Murate T. Regulation of sphingosine kinase 1 gene expression by protein kinase C in a human leukemia cell line, MEG-O1. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1635(2-3):104-16.

- Nava VE**, Cuvillier O, Edsall LC, Kimura K, Milstien S, Gelmann EP, Spiegel S. Sphingosine enhances apoptosis of radiation-resistant prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2000; 4468–4474.
- Nava VE**, Lacana E, Poulton S, Liu H, Sugiura M, Kono K, Milstien S, Kohama T, Spiegel S. Functional characterization of human sphingosine kinase-1. *FEBS Lett.* 2000; 473(1):81-4.
- Nava VE**, Hobson JP, Murthy S, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinase type 1 promotes estrogen-dependent tumorigenesis of breast cancer MCF-7 cells. *Exp Cell Res.* 2002;281(1):115-27.
- Olivera A**, Rosenthal J, Spiegel S. Effect of acidic phospholipids on sphingosine kinase. *J Cell Biochem.* 1996; 60(4):529-37.
- Olivera A**, Spiegel S. Sphingosine kinase: a mediator of vital cellular functions. *Prostaglandins.* 2001;64(1-4):123-134.
- Olivera A**, Urtz N, Mizugishi K, Yamashita Y, Gilfillan AM, Furumoto Y, Gu H, Proia RL, Baumruker T, Rivera J. IgE-dependent activation of sphingosine kinases 1 and 2 and secretion of sphingosine 1-phosphate requires Fyn kinase and contributes to mast cell responses. *J Biol Chem.* 2006; 281(5):2515-25.
- Oskouiian B**, Mendel J, Shocron E, Lee MA Jr, Fyrst H, Saba JD. Regulation of sphingosine-1-phosphate lyase gene expression by members of the GATA family of transcription factors. *J Biol Chem.* 2005; 280(18):18403-10.
- Oskouiian B**, Sooriyakumaran P, Borowsky AD, Crans A, Dillard-Telm L, Tam YY, Bandhuvula P, Saba JD. Sphingosine-1-phosphate lyase potentiates apoptosis via p53- and p38-dependent pathways and is down-regulated in colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(46):17384-9.
- Oskouiian B**, Saba JD. Cancer treatment strategies targeting sphingolipid metabolism. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 688:185-205.
- Otala M**, Suomalainen L, Pentikäinen MO, Kovanen P, Tenhunen M, Erkkilä K, Toppari J, Dunkel L. Protection from radiation-induced male germ cell loss by sphingosine-1-phosphate. *Biol Reprod.* 2004;70(3):759-67.
- Park KS**, Kim MK, Lee HY, Kim SD, Lee SY, Kim JM, Ryu SH, Bae YS. S1P stimulates chemotactic migration and invasion in OVCAR3 ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;356(1):239-44.
- Patton EE**, Widlund HR, Kutok JL, Kopani KR, Amatruda JF, Murphey RD, Berghmans S, Mayhall EA, Traver D, Fletcher CD, Aster JC, Granter SR, Look AT, Lee C, Fisher DE, Zon LI. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol.* 2005;15(3):249-54.
- Pchejetski D**, Golzio M, Bonhoure E, Calvet C, Doumerc N, Garcia V, Mazerolles C, Rischmann P, Teissié J, Malavaud B, Cuvillier O. Sphingosine kinase-1 as a chemotherapy sensor in prostate adenocarcinoma cell and mouse models. *Cancer Res.* 2005;65(24):11667-75
- Pitson SM**, Moretti PA, Zebol JR, Lynn HE, Xia P, Vadas MA, Wattenberg BW. Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation. *EMBO J.* 2003; 22(20):5491-500.
- Portoukalian J**, Zwingelstein G, Doré JF. Lipid composition of human malignant melanoma tumors at various levels of malignant growth. *Eur J Biochem.* 1979 ;94(1):19-23.
- Postma FR**, Jalink K, Hengeveld T, Moolenaar WH. Sphingosine-1-phosphate rapidly induces Rho-dependent neurite retraction: action through a specific cell surface receptor. *EMBO J.* 1996;15(10):2388-92.
- Raisova M**, Goltz G, Bektas M, Bielawska A, Riebeling C, Hossini AM, Eberle J, Hannun YA, Orfanos CE, Geilen CC. Bcl-2 overexpression prevents apoptosis induced by ceramidase inhibitors in malignant melanoma and HaCaT keratinocytes. *FEBS Lett.* 2002;516(1-3):47-52.
- Rigel DS**, Rivers JK, Kopf AW, Friedman RJ, Vinokur AF, Heilman ER, Levenstein M. Dysplastic nevi. Markers for increased risk for melanoma. *Cancer.* 1989;63(2):386-89.
- Rivers JK**. Is there more than one road to Melanoma? *Lancet.* 2004;363: 728–30.
- Rosenberg SA**, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer : A clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2008;8:299-308.

- Ruckhäberle E**, Rody A, Engels K, Gaetje R, von Minckwitz G, Schiffmann S, Grösch S, Geisslinger G, Holtrich U, Karn T, Kaufmann M. Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;112(1):41-52.
- Ryland LK**, Fox TE, Liu X, Loughran TP, Kester M. Dysregulation of sphingolipid metabolism in cancer. *Cancer Biol Ther.* 2011;11(2):138-49.
- Salinas NR**, Lopes CT, Palma PV, Oshima CT, Bueno V. Lung tumor development in the presence of sphingosine 1-phosphate agonist FTY720. *Pathol Oncol Res.* 2009;15(4):549-54.
- Salti GI**, Manouagian T, Farolan M, Shilkaitis A, Majumdar D, Das Gupta TK. Microphthalmia transcription factor: a new prognostic marker in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. *Cancer Res.* 2000; 60(18):5012-6.
- Samy ET**, Meyer CA, Caplazi P, Langrish CL, Lora JM, Bluethmann H, Peng SL. Cutting edge: Modulation of intestinal autoimmunity and IL-2 signaling by sphingosine kinase 2 independent of sphingosine 1-phosphate. *J Immunol.* 2007;179(9):5644-8.
- Sanchez T**, Estrada-Hernandez T, Paik JH, Wu MT, Venkataraman K, Brinkmann V, Claffey K, Hla T. Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability. *J Biol Chem.* 2003;278(47):47281-90.
- Sanchez T**, Skoura A, Wu MT, Casserly B, Harrington EO, Hla T. Induction of vascular permeability by the sphingosine-1-phosphate receptor-2 (S1P2R) and its downstream effectors ROCK and PTEN. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27(6):1312-8.
- Sandhoff, R.** Very long chain sphingolipids: tissue expression, function and synthesis. *FEBS Letters.* 2010 ; 584: 1907-13.
- Sankala HM**, Hait NC, Paugh SW, Shida D, Lépine S, Elmore LW, Dent P, Milstien S, Spiegel S. Involvement of sphingosine kinase 2 in p53-independent induction of p21 by the chemotherapeutic drug doxorubicin. *Cancer Res.* 2007;67(21):10466-74
- Schaffer JV**, Bologna JL. The melanocortin-1 receptor: red hair and beyond. *Arch Dermatol.* 2001; 137(11):1477-85.
- Schmahl J**, Raymond CS, Soriano P. PDGF signaling specificity is mediated through multiple immediate early genes. *Nat Genet.* 2007; 39(1):52-60.
- Schmid G**, Guba M, Ischenko I, Papyan A, Joka M, Schrepfer S, Bruns CJ, Jauch KW, Heeschen C, Graeb C. The immunosuppressant FTY720 inhibits tumor angiogenesis via the sphingosine 1-phosphate receptor 1. *J Cell Biochem.* 2007;101(1):259-70.
- Schüppel M**, Kürschner U, Kleuser U, Schäfer-Korting M, Kleuser B. Sphingosine 1-phosphate restrains insulin-mediated keratinocyte proliferation via inhibition of Akt through the S1P2 receptor subtype. *J Invest Dermatol.* 2008;128(7):1747-56.
- Schwab SR**, Pereira JP, Matloubian M, Xu Y, Huang Y, Cyster JG. Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science.* 2005; 309(5741):1735-9.
- Schwalm S**, Döll F, Römer I, Bubnova S, Pfeilschifter J, Huwiler A. Sphingosine kinase-1 is a hypoxia-regulated gene that stimulates migration of human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;368(4):1020-5.
- Schwartzentruber D**, Lawson D, Richards J, Conry RM, Miller D, Triesman J, Gailani F, Riley LB, Vena D, Hwu P. A phase III multi- institutional randomized study of immunization with the gp-100:209–217(210M) peptide followed by high-dose interleukin-2 compared with high-dose interleukin-2 alone in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts).* 2009;27(18s).
- Selzer E**, Wacheck V, Lucas T, Heere-Ress E, Wu M, Weilbaecher KN, Schlegel W, Valent P, Wrba F, Pehamberger H, Fisher D, Jansen B. The melanocyte-specific isoform of the microphthalmia transcription factor affects the phenotype of human melanoma. *Cancer Res.* 2002. 62(7):2098-103.

Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell*. 1996;85(1):27-37.

Shu X, Wu W, Mosteller RD, Broek D. Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol*. 2002; 22(22):7758-68.

Smalley KS, Xiao M, Villanueva J, Nguyen TK, Flaherty KT, Letrero R, Van Belle P, Elder DE, Wang Y, Nathanson KL, Herlyn M. CRAF inhibition induces apoptosis in melanoma cells with non-V600E BRAF mutations. *Oncogene*. 2009; 28(1):85-94.

Smalley KS. Understanding melanoma signaling networks as the basis for molecular targeted therapy. *J Invest Dermatol*. 2010; 130(1):28-37.

Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4(5):397-407.

Spitler LE, Weber RW, Allen RE. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, sargramostim) administered for 3 years as adjuvant therapy of stages II(T4), III, and IV melanoma. *J Immunother*. 2009;32(6): 632–637.

Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, et al. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res*. 2004 ;64:7002–10.

Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor *PTEN*. *Cell* 1998;95:29–39.

Strub GM, Maceyka M, Hait NC, Milstien S, Spiegel S. Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Adv Exp Med Biol*. 2010;688:141-55.

Sutherland CM, Moretti PA, Hewitt NM, Bagley CJ, Vadas MA, Pitson SM. The calmodulin-binding site of sphingosine kinase and its role in agonist-dependent translocation of sphingosine kinase 1 to the plasma membrane. *J Biol Chem*. 2006; 281(17):11693-701.

Taha TA, Osta W, Kozhaya L, Bielawski J, Johnson KR, Gillanders WE, Dbaibo GS, Hannun YA, Obeid LM. Down-regulation of sphingosine kinase-1 by DNA damage: dependence on proteases and p53. *J Biol Chem*. 2004;279(19):20546-54.

Taha TA, Hannun YA, Obeid LM. Sphingosine kinase: biochemical and cellular regulation and role in disease. *J Biochem Mol Biol*. 2006; 39(2):113-31.

Takabe K, Kim RH, Allegood JC, Mitra P, Ramachandran S, Nagahashi M, Harikumar KB, Hait NC, Milstien S, Spiegel S. Estradiol induces export of sphingosine 1-phosphate from breast cancer cells via ABCG1 and ABCG2. *J Biol Chem*. 2010; 285(14):10477-86.

Tanimoto T, Jin ZG, Berk BC. Transactivation of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR is involved in sphingosine 1-phosphate-stimulated phosphorylation of Akt and endothelial nitric-oxide synthase (eNOS). *J Biol Chem*. 2002;277(45):42997-3001.

Tap WD, Gong KW, Dering J, Tseng Y, Ginther C, Pauletti G, Glaspy JA, Essner R, Bollag G, Hirth P, Zhang C, Slamon DJ. Pharmacodynamic characterization of the efficacy signals due to selective BRAF inhibition with PLX4032 in malignant melanoma. *Neoplasia*. 2010;12(8):637-49.

Thomas CP, Buronfosse A, Combaret V, Pedron S, Fertil B, Portoukalian J. Gangliosides protect human melanoma cells from ionizing radiation-induced clonogenic cell death. *Glycoconj J*. 1996;13(3):377-84.

Thomas NE. BRAF somatic mutations in malignant melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Res*. 2006;16(2):97-103.

Tilly JL, Kolesnick RN. Sphingolipids, apoptosis, cancer treatments and the ovary: investigating a crime against female fertility. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1585(2-3):135-8.

Tran MA, Smith CD, Kester M, Robertson GP. Combining nanoliposomal ceramide with sorafenib synergistically inhibits melanoma and breast cancer cell survival to decrease tumor development. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(11):3571-81.

Troppmair J, Rapp UR. Raf and the road to cell survival: a tale of bad spells, ring bearers and detours. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(8):1341-45.

Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol.* 2004;122(2):337-41.

Tucker MA, Goldstein AM. Melanoma etiology: where are we?. *Oncogene.* 2003; 22:3042-52.

Valaperta R, Chigorno V, Basso L, Prinetti A, Bresciani R, Preti A, Miyagi T, Sonnino S. Plasma membrane production of ceramide from ganglioside GM3 in human fibroblasts. *FASEB J.* 2006. 20(8):1227-9.

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(8):695-705.

Van Veldhoven PP, Mannaerts GP. Sphinganine 1-phosphate metabolism in cultured skin fibroblasts: evidence for the existence of a sphingosine phosphatase. *Biochem J.* 1994;299 (Pt 3):597-601.

Van Veldhoven PP, Gijsbers S, Mannaerts GP, Vermeesch JR, Brys V. Human sphingosine-1-phosphate lyase: cDNA cloning, functional expression studies and mapping to chromosome 10q22(1). *Biochim Biophys Acta.* 2000;1487(2-3):128-34.

Venkataraman K, Thangada S, Michaud J, Oo ML, Ai Y, Lee YM, Wu M, Parikh NS, Khan F, Proia RL, Hla T. Extracellular export of sphingosine kinase-1a contributes to the vascular S1P gradient. *Biochem J.* 2006; 397(3):461-71.

Venkataraman K, Lee YM, Michaud J, Thangada S, Ai Y, Bonkovsky HL, Parikh NS, Habrukowich C, Hla T. Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circ Res.* 2008;102(6):669-76.

Visentín B, Vekich JA, Sibbald BJ, Cavalli AL, Moreno KM, Matteo RG, Garland WA, Lu Y, Yu S, Hall HS, Kundra V, Mills GB, Sabbadini RA. 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(3):225-38.

Walzer T, Chiossone L, Chaix J, Calver A, Carozzo C, Garrigue-Antar L, Jacques Y, Baratin M, Tomasello E, Vivier E. Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1337-44.

Watson C, Long JS, Orange C, Tannahill CL, Mallon E, McGlynn LM, Pyne S, Pyne NJ, Edwards J. High expression of sphingosine 1-phosphate receptors, S1P1 and S1P3, sphingosine kinase 1, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 is associated with development of tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer patients. *Am J Pathol.* 2010;177(5):2205-15.

Weiner JA, Fukushima N, Contos JJ, Scherer SS, Chun J. Regulation of Schwann cell morphology and adhesion by receptor-mediated lysophosphatidic acid signaling. *J Neurosci.* 2001; 21(18):7069-78.

Weiss M, Hettmer S, Smith P, Ladisch S. Inhibition of melanoma tumor growth by a novel inhibitor of glucosylceramide synthase. *Cancer Res.* 2003;63(13):3654-8.

Wellbrock C, Marais R. Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *J Cell Biol.* 2005;170(5):703-8.

Wellbrock C, Rana S, Paterson H, Pickersgill H, Brummelkamp T, Marais R. Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. *PLoS One.* 2008; 3(7):e2734.

Wellbrock C, Hurlstone A. BRAF as therapeutic target in melanoma. *Biochem Pharmacol.* 2010;80(5):561-67.

Wu W, Shu X, Hovsepian H, Mosteller RD, Broek D. VEGF receptor expression and signaling in human bladder tumors. *Oncogene.* 2003; 22(22):3361-70.

Wyman K, Atkins MB, Prieto V, Eton O, McDermott DF, Hubbard F, Byrnes C, Sanders K, Sosman JA. Multicenter Phase II trial of high-dose imatinib mesylate in metastatic melanoma: significant toxicity with no clinical efficacy. *Cancer.* 2006;106(9):2005-11.

Xia P, Gamble JR, Wang L, Pitson SM, Moretti PA, Wattenberg BW, D'Andrea RJ, Vadas MA. An oncogenic role of sphingosine kinase. *Curr Biol.* 2000;10(23):1527-30.

Yamanaka M, Shegogue D, Pei H, Bu S, Bielawska A, Bielawski J, Pettus B, Hannun YA, Obeid L, Trojanowska M. Sphingosine kinase 1 (SPHK1) is induced by transforming growth factor-beta and mediates TIMP-1 up-regulation. *J Biol Chem*. 2004;279(52):53994-4001.

Zhan X, Desiderio DM. Nitroproteins from a human pituitary adenoma tissue discovered with a nitrotyrosine affinity column and tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2006;354(2):279-89.

Zhang H, Desai NN, Olivera A, Seki T, Brooker G, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J Cell Biol*. 1991;114(1):155-67.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
LISTE DU CORPS ENSEIGNANT DE LA FACULTE	4
RESUME	6
LISTE DES ABREVIATIONS	7
SOMMAIRE	10
INTRODUCTION	12
CHAPITRE 1-LE MELANOME	12
I. Généralités sur la peau	12
I.1 La peau.....	12
I.2 Les tumeurs cutanées	15
II. Le mélanome	16
II. 1 Généralités et classification	16
II.2 Epidémiologie.....	18
a) Prévalence, incidence, mortalité et survie	18
b) Les facteurs de risque	19
II.3 Oncogénèse du mélanome cutané : les bases moléculaires	21
a) Les oncogènes de la voie des MAPKs	23
b) Les autres acteurs moléculaires	27
II.4 Diagnostic	32
II.5 Traitements	35
a) Résection chirurgicale d'un mélanome primaire.....	35
b) Traitement post-opératoire chez des patients à haut risque de récurrence	35
c) Prise en charge des formes localement avancées et des métastases en transit	36
d) Prise en charge des formes disséminées	38
e) Les thérapies émergentes ou thérapies ciblées	40
III. Modélisation du mélanome	45
III.1 Modèles cliniques.....	47
III.2 Modèles in vitro.....	48
a) Culture cellulaire	48
b) Modèles en 2 dimensions et 3 dimensions (2D et 3D).....	49
III.2 Modèles in vivo	50
a) Xénogreffes	50
b) Animaux transgéniques	51
CHAPITRE 2- LES SPHINGOLIPIDES	53

<i>I. Généralités</i>	53
I.1 Structure	53
I.2 Métabolisme et distribution subcellulaire	54
<i>II. La sphingosine 1-phosphate, un lipide bioactif</i>	56
II.1 Métabolisme de la sphingosine 1-phosphate (S1P)	56
a) Synthèse de la S1P : les sphingosines kinases 1 et 2.....	57
b) Dégradation de la S1P : S1P phosphatase et S1P lyase.....	61
II.2 Localisation cellulaire et transport de la S1P.....	64
a) Sources de S1P et gradient de concentration.....	64
b) Sécrétion/export de S1P et enrichissement dans le plasma	65
II.3 Cibles et mode d'action de la S1P	66
a) Action extracellulaire : les récepteurs de la S1P	66
b) Action intracellulaire.....	69
II.4 La S1P, un lipide aux nombreuses fonctions biologiques	70
a) Rôle dans le système vasculaire et l'angiogenèse	70
b) Rôle dans l'immunité et l'inflammation	71
c) Rôle dans le système nerveux central (SNC)	72
d) Rôle dans le développement et le système squelettique.....	72
e) Rôle dans le système reproducteur.....	73
<i>III. Sphingosine 1-Phosphate et Cancer</i>	73
III.1 Dérégulation du métabolisme de la S1P dans le cancer et thérapies associées	73
a) Les enzymes	73
b) Le lipide phosphate : la S1P.....	75
c) Les thérapies visant la S1P.....	79
III.2 Les Sphingolipides et la Sphingosine 1-phosphate dans le mélanome	80
a) Les Sphingolipides	80
b) La Sphingosine 1-phosphate	80
MATERIELS ET METHODES	82
<i>I. Culture cellulaire</i>	82
I.1 Lignées cellulaires.....	82
I.2 Transfections transitoires et stables	82
a) Transfections transitoires	82
b) Transfections stables	83
<i>II. Etude de la résistance cellulaire au traitement par la Dacarbazine</i>	84
II.1 Traitement par la Dacarbazine.....	84
II.2 Test de viabilité cellulaire.....	84

<i>III. Etude de la migration cellulaire</i>	84
<i>IV. Etude de la sécrétion de SIP</i>	85
<i>V. Analyse de l'expression du gène SPHK1 ou SGPL1 par RT-QPCR</i>	85
<i>VI. Analyse immunohistochimique</i>	86
<i>VII. Western Blot</i>	86
VII.1 Les anticorps utilisés.....	86
VII.2 La technique.....	86
<i>VIII. Mesure de l'activité enzymatique de la Sphingosine kinase 1</i>	87
<i>IX. Analyse de l'expression du gène BRAF par RT-PCR</i>	87
<i>X. Cytométrie en flux</i>	87
<i>XI. Analyses statistiques</i>	88
RESULTATS EXPERIMENTAUX	89
<i>I. Hypothèses de travail et objectifs de l'étude</i>	89
<i>II. Etude du métabolisme de la SIP dans les cellules de mélanome</i>	89
II.1 Profil d'expression des gènes SPHK1 et SGPL1 dans des lignées de mélanome et de mélanocytes.....	89
II.2 Profil d'expression de la SK1 dans des lignées de mélanome et de mélanocytes.....	90
II.3 Profil d'activité de la SK1 dans des lignées de mélanome et de mélanocytes.....	92
<i>III. Etude du rôle de SIP/SK1 sur la migration cellulaire</i>	93
III.1 Après variation de l'expression de SK1.....	93
III.2 Après blocage des récepteurs S1PRs.....	95
<i>IV. Etude du rôle de SK1 sur la chimiorésistance du mélanome</i>	96
<i>V. Effets de la surexpression ou de l'inhibition de BRaf sur l'expression de SK1</i>	98
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	101
BIBLIOGRAPHIE	108
TABLE DES MATIERES	120
SERMENT DE GALIEN	123

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.