

La voie Sphingosine kinase-1/Sphingosine 1-phosphate dans l'hypoxie tumorale

Olivier Cuvillier

Institut de pharmacologie et de biologie structurale, CNRS UMR5089, Toulouse

olivier.cuvillier@inserm.fr

Les facteurs HIF : facteurs clés de l'adaptation à l'hypoxie

Les cellules cancéreuses sont souvent confrontées à une diminution de leur approvisionnement en oxygène. Les conséquences de cette hypoxie sont multiples : néovascularisation et résistance aux thérapies conventionnelles. D'un point de vue mécanistique, l'hypoxie entraîne la stabilisation des facteurs de transcription HIF

(Hypoxia Inducible Factor) dont HIF-1 est le représentant canonique [1]. Ces facteurs sont composés d'une sous-unité HIF α régulée par le taux d'oxygène, et d'une sous-unité HIF β exprimée de manière constitutive. En normoxie, la protéine est hydroxylée par des prolyl-hydroxylases (PHD) et est alors reconnue par le suppresseur de tumeur pVHL (protéine de Von Hippel-Lindau), entraînant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. En condition hypoxique, les PHD sont inactives, HIF α n'est plus dégradée

et s'accumule avant de rejoindre le noyau et de s'associer avec son partenaire HIF β , formant le facteur HIF. Le dimère ainsi formé se fixe sur les séquences consensus HRE (Hypoxia Responsive Element) contenues dans les promoteurs de gènes cibles (plus de 100) dont le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), l'érythropoïétine ou encore les transporteurs de glucose GLUT. Ces gènes induits par l'hypoxie sont impliqués dans la prolifération, la survie, l'angiogenèse, le métabolisme du glucose et la régulation du pH [1]. Surexprimé dans de nombreux cancers et corrélé à un mauvais pronostic et à l'échec thérapeutique, HIF-1, principal facteur de réponse à l'hypoxie, représente donc une cible de choix pour de futures stratégies thérapeutiques.

Quand la sphingosine 1-phosphate rencontre la signalisation hypoxique...

La sphingosine 1-phosphate (S1P) est un lipide impliqué dans la régulation de la prolifération, la survie, la migration, l'invasion et l'angiogenèse. La S1P est le produit de la phosphorylation de la sphingosine par la sphingosine kinase (figure 1). Bien que deux isoformes de sphingosine kinase (SphK) existent, le rôle de la SphK2 est beaucoup moins caractérisé dans le cancer que celui de la SphK1. L'équilibre entre les taux intracellulaires de S1P et ceux de ses précurseurs métaboliques, céramide et sphingosine pro-apoptotiques, détermine le destin de la cellule [2]. La SphK1 est stimulée par de nombreux agonistes (figure 1) et la S1P générée peut agir en dehors de la cellule en se liant à l'un des cinq récepteurs de S1P (S1P₁₋₅ de type RCPG) pour induire une cascade de signalisation paracrine ou autocrine, ou dans la cellule, par des méca-

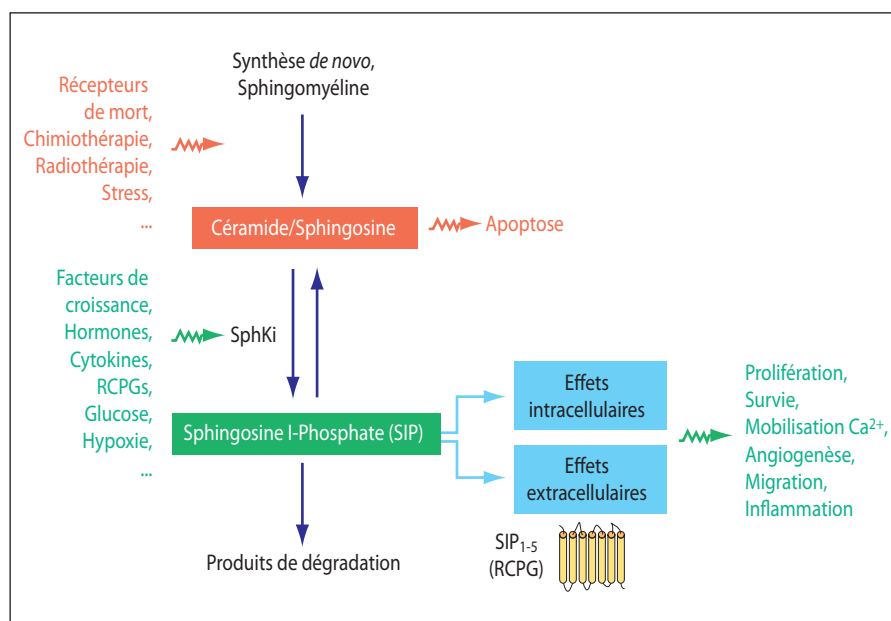


Figure 1. Métabolisme de la sphingosine 1-phosphate. La stimulation de l'activité sphingosine kinase-1 (SphK1) par les facteurs de croissance, certaines hormones, cytokines, récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), etc. conduit à la production de sphingosine 1-phosphate (S1P) qui peut agir à l'intérieur de la cellule (sur des cibles mal connues) ou à l'extérieur de la cellule en se liant aux 5 RCPG spécifiques de la S1P (S1P₁₋₅) pour entraîner des effets prolifératifs, anti-apoptotiques, pro-angiogéniques, etc., alors que les précurseurs de la S1P, céramide et sphingosine, entraînent l'apoptose en réponse à divers stress dont la chimio- et la radiothérapie.

nismes qui restent, pour une large part, à élucider. Au-delà de son potentiel oncogénique, la SphK1 est surexprimée dans les tumeurs et corrélée à un mauvais pronostic. Plusieurs études ont suggéré un rôle pour la S1P dans la réponse à l'hypoxie dans des cellules non-tumorales. La SphK1 est ainsi impliquée dans l'adaptation des cardiomyocytes à l'ischémie ; par ailleurs, l'hypoxie stimule la prolifération de cellules musculaires lisses de façon dépendante de la S1P. Dans les cellules endothéliales, la S1P peut également agir comme un activateur de HIF-1 α , indépendamment du taux d'oxygène, par une signalisation tributaire du récepteur S1P₂. En accord avec une étude montrant que son activation dans les cellules endothéliales accroît la perméabilité vasculaire, l'expression du récepteur S1P₂ serait induite par l'hypoxie dans la rétine de souris,

caractérisée par une angiogenèse pathologique. Cette néovascularisation est supprimée dans les animaux S1P₂^{-/-} soumis à une ischémie rétinienne, suggérant que le S1P₂ est crucial pour la réponse des cellules endothéliales à l'hypoxie. En dépit de l'importance de l'hypoxie dans le cancer, le lien entre la S1P et l'adaptation à l'hypoxie n'a été que récemment exploré. Nos travaux suggèrent un rôle canonique de la SphK1 dans l'adaptation des cellules tumorales à l'hypoxie [3]. Une stimulation rapide et transitoire de la SphK1, précédant l'accumulation de HIF-1 α , est observée sous hypoxie dans divers modèles (prostate, sein, glioblastome, rein, poumon). Cette stimulation de la SphK1 est subordonnée à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). De nombreux travaux suggèrent que les ROS modulent directement

le taux de HIF-1 α à travers l'inhibition des PHD [4] ; les ROS pourraient également réguler indirectement la stabilisation de HIF-1 α via la voie Akt/GSK3 β [5]. Nous avons observé que la stabilisation de HIF-1 α induite par la SphK1 via les ROS au cours de l'hypoxie est contrôlée par la voie Akt/GSK3 β [3].

Comment la S1P produite en réponse à la stimulation de la SphK1 en hypoxie active-t-elle cette voie Akt/GSK3 β (effet intracellulaire ou effet autocrine) ?

Il est tentant de postuler que la S1P agit via ses récepteurs puisque la voie PI3K/Akt est activable par tous les récepteurs à S1P (figure 2). De plus, la voie PI3K/Akt/GSK3 β est activée dans les cellules endothéliales par l'addition de S1P [6]. Des travaux sont en cours pour évaluer la contribution de la signalisation extracellulaire de la S1P sur cette voie.

Démontrant le rôle central de la SphK1 dans l'adaptation des cellules cancéreuses à l'hypoxie, l'inhibition de la SphK1 bloque la voie Akt/GSK3 β , l'accumulation de HIF-1 α et l'activité transcriptionnelle de HIF-1 (figure 2). Le mécanisme majeur de la régulation de HIF-1 α lors de l'hypoxie est sa dégradation par la voie du protéasome. En hypoxie, l'inhibition du protéasome reverse complètement la dégradation de HIF-1 α induite par l'inhibition de la SphK1. De plus, à l'aide de lignées déficientes ou reconstituées en pVHL, nous avons mis en évidence que la stabilisation de HIF-1 α médiée par la SphK1 et le protéasome, est dépendante de pVHL.

Bien que HIF-1 α soit décrit comme le pivot central de l'adaptation au stress hypoxique dans de nombreux types tumoraux, il apparaît maintenant que HIF-2 α peut réguler des gènes et des fonctions physiologiques uniques. Les rôles distincts de HIF-1 α et HIF-2 α ont été bien définis dans les carcinomes rénaux à cellules claires (RCC) associés à la maladie de von Hippel-Lindau [7], lesquels accumulent soit HIF-1 α et HIF-2 α soit HIF-2 α seul. Dans ce type de tumeurs, le rôle de HIF-2 α en tant que marqueur d'agressivité a été récemment souligné [8]. La voie de la SphK1/S1P et celle de HIF-2 α semblent également liées dans une lignée de glioblastome, comme cela a été montré en utilisant un mimétique de l'hypoxie (CoCl₂). Dans ces conditions d'hypoxie expérimentale, une augmentation de l'ARNm, du taux protéique et de l'activité de la SphK1 a été rapportée. Une stratégie d'ARN interférence dirigée contre HIF-2 α inhibe l'augmentation de la SphK1 alors que l'extinction de HIF-1 α par ARN

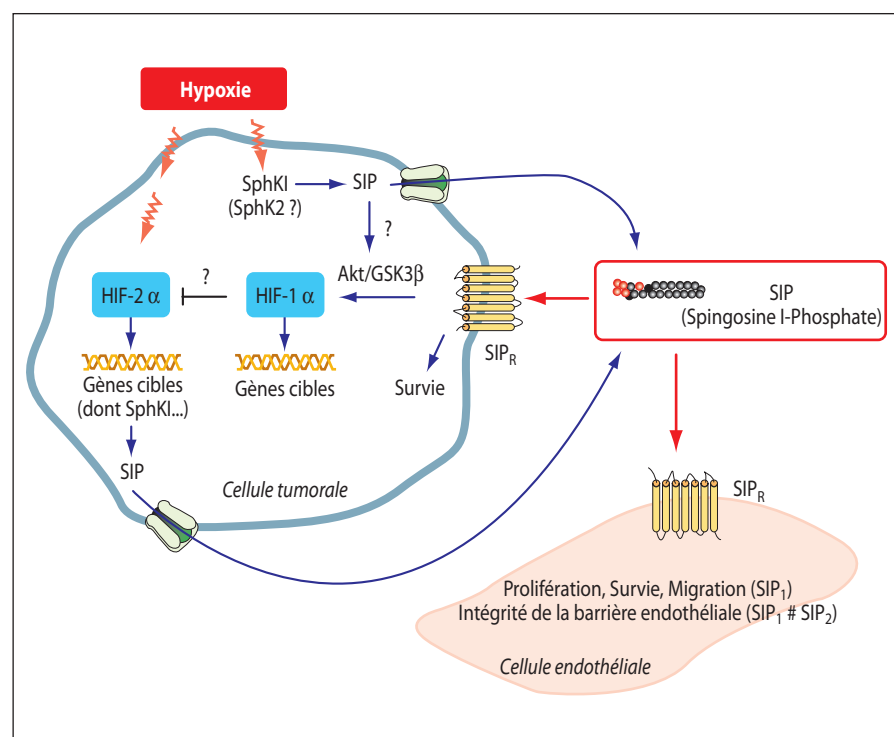


Figure 2. Modèle de signalisation impliquant la sphingosine 1-phosphate au cours de l'hypoxie. En hypoxie, la SphK1 est rapidement et transitoirement stimulée, ce qui conduit à la production de S1P, laquelle active la voie Akt/GSK3 β qui régule le taux de HIF-1 α . Ce mécanisme implique vraisemblablement un mécanisme autocrine dépendant des récepteurs à S1P bien qu'un effet intracellulaire ne puisse être exclu. L'accumulation de HIF-2 α observée sous hypoxie pourrait conduire à une activation retardée de la signalisation SphK1/S1P avec sécrétion de S1P (voir texte pour plus de détails). La S1P produite en amont ou en aval des facteurs HIF1/2, et libérée des cellules tumorales hypoxiques, pourrait agir de manière autocrine et conduire à une amplification potentielle de la signalisation HIF-1/2, mais aussi de manière paracrine sur les cellules endothéliales avec des effets sur la prolifération, la survie, la migration et l'intégrité de la barrière endothéliale (avec effets opposés selon la nature des récepteurs de S1P exprimés). S1P_R signifie que le sous-type de récepteur n'est pas défini.

interférence conduit à une augmentation du taux de HIF-2 α et de la SphK1 (*figure 2*). Anelli *et al.* suggèrent que les facteurs HIF-1 et HIF-2 seraient en compétition pour interagir avec les séquences HRE présentes dans le promoteur de la SphK1, l'association avec HIF-2 stimulant la SphK1 alors que la liaison avec HIF-1 l'inhiberait [9]. Bien qu'apparemment contradictoires avec nos travaux dans lesquels nous montrons – dans la même lignée tumorale – que l'augmentation d'activité de la SphK1 induite par l'hypoxie serait un signal en amont de la stabilisation de HIF-1 α , il est important de noter que, dans l'étude d'Anelli *et al.* l'influence de l'activité de la SphK1 sur le taux de HIF-1 α n'a pas été étudiée. De plus, l'hypoxie expérimentale utilisée dans ces travaux ne met pas en jeu les mêmes voies de signalisation que dans le cas de l'hypoxie vraie (0,1 % O₂) utilisée dans notre étude. Il est néanmoins envisageable que l'activité SphK1 régule en premier lieu l'activité de HIF-1 α (et/ou HIF-2 α) qui régulerait à son tour la transcription de la SphK1 et ainsi la survie et l'angiogenèse contrôlées par la S1P. Des études supplémentaires sont indispensables pour déterminer si la SphK1 est un gène cible de HIF-2 α ; et si l'activité de la SphK1 contrôle HIF-2 α comme dans le cas de HIF-1 α , dans des modèles pertinents tels que les RCC. Nos résultats les plus récents démontrent que tel est le cas (Bouquerel *et al.*, non publié).

Il faut noter que (lorsqu'elle est étudiée) la stimulation de la SphK1, voire de la SphK2, est associée à une libération de S1P des cellules tumorales hypoxiques [9, 10]. Cela indique que la S1P libérée des cellules tumorales hypoxiques pourrait manifester une activité autocrine sur ces cellules avec : (i) amplification potentielle de la signalisation HIF-1/2 (ce qui reste à prouver) ; ou (ii) induction de la résistance à l'apoptose en réponse à des thérapies anti-tumorales. Un effet paracrine de la S1P a été aussi observé sur les cellules endothéliales. Prétraitées avec un antagoniste des récepteurs S1P_{1/3} (le VPC23019) ou pré-incubées avec des siRNA anti-S1P₁, les HUVEC perdent leur capacité à former des tubes en présence du milieu conditionné de cellules tumorales cultivées en hypoxie [9], illustrant l'effet angiogénique bien établi de la S1P (*figure 2*).

Pour le clinicien

La validation du rôle de la voie SphK1/S1P en tant que régulateur clé dans l'adaptation des cellules tumorales à l'hypoxie, et plus particulièrement du contrôle des taux de HIF-1 α et HIF-2 α , suggère l'utilisation de stratégies anti-SphK1/anti-S1P dans le but de bloquer l'activité transcriptionnelle de ces facteurs HIF. Ce ciblage de la voie SphK1/S1P répond à ces critères d'approche non conventionnelle, visant notamment à briser le cercle vicieux hypoxie/angiogenèse. L'inhibition de la voie SphK1/S1P pourrait entraîner une meilleure perfusion vasculaire de la tumeur et améliorer la réponse aux traitements conventionnels selon le concept de normalisation vasculaire démontré avec les stratégies anti-VEGF. Un anticorps monoclonal humanisé anti-S1P (sonenpizumab) est en cours de développement clinique (Phase I rendue publique en 2010). Cet anticorps est actuellement en cours de validation au laboratoire sur un modèle pré-clinique de cancer de la prostate (en combinaison avec une chimiothérapie), qui pourrait servir de fondement à la mise en place de protocoles de recherche clinique chez l'homme.

... on peut concevoir de nouvelles cibles thérapeutiques

En complément des stratégies spécifiques anti-angiogéniques, d'autres approches ciblant les voies de régulation contrôlant l'activité de HIF-1 (et de HIF-2) représentent une stratégie intéressante pour contrôler l'hypoxie et ses conséquences, en particulier la néo-angiogenèse. Le ciblage de la voie SphK1/S1P répond à ces critères d'approche non-conventionnelle visant à briser le cercle vicieux hypoxie/angiogenèse. L'inhibition de la voie SphK1/S1P entraînerait une oxygénation de la tumeur et améliorerait la réponse aux traitements conventionnels selon le concept de normalisation vasculaire introduit par Jain *et al.* [11]. Il faut souligner que la S1P exerce des effets spécifiques sur les cellules endothéliales – via les récepteurs de S1P très abondants sur ces cellules – afin de promouvoir la formation de vaisseaux au cours du développement tumoral. Pour cette raison, l'extinction de la voie SphK1/S1P présente l'intérêt d'agir à la fois sur le compartiment tumoral mais aussi sur la composante endothéliale. Cette stratégie originale nous permet donc d'envisager :
– un effet indirect sur l'angiogenèse dû à une diminution de l'activité de HIF-1 (et

HIF-2) dans les cellules tumorales hypoxiques, conduisant à une inhibition de la production de facteurs pro-angiogéniques type VEGF ;
– un effet anti-angiogénique direct sur les cellules endothéliales, équivalent à celui observé avec les thérapies anti-VEGF actuelles.

Conflits d'intérêts : contrat de collaborateur (L Path Therapeutics).

Références

1. Rankin EB, *et al.* *Cell Death Differ* 2008 ; 15 : 678-85.
2. Cuvillier O, *et al.* *Nature* 1996 ; 381 : 800-3.
3. Ader I, *et al.* *Cancer Res* 2008 ; 68 : 8635-42.
4. Kaelin WG, *et al.* *Mol Cell* 2008 ; 30 : 393-402.
5. Skuli N, *et al.* *Cancer Res* 2006 ; 66 : 482-9.
6. Gonzalez E, *et al.* *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 3210-6.
7. Kaelin WG. *Cancer Cell* 2008 ; 14 : 423-4.
8. Gordan JD, *et al.* *Cancer Cell* 2008 ; 14 : 435-46.
9. Anelli V, *et al.* *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 3365-75.
10. Schnitzer SE, *et al.* *Mol Cancer Res* 2009 ; 7 : 393-401.
11. Jain RK. *Science* 2005 ; 307 : 58-62.