



HAL
open science

**Etude des altérations du métabolisme de la
sphingosine-1-phosphate dans le mélanome cutané: rôle
sur l'infiltration et la polarisation des macrophages
associés aux tumeurs**

Marguerite Mrad

► **To cite this version:**

Marguerite Mrad. Etude des altérations du métabolisme de la sphingosine-1-phosphate dans le mélanome cutané: rôle sur l'infiltration et la polarisation des macrophages associés aux tumeurs. Cancer. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT: 2016TOU30215. tel-01540272

HAL Id: tel-01540272

<https://theses.hal.science/tel-01540272>

Submitted on 16 Jun 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Marguerite MRAD

Le vendredi 19 février 2016

Titre :

Étude des altérations du métabolisme de la sphingosine-1-phosphate dans le mélanome cutané: rôle sur l'infiltration et la polarisation des macrophages associés aux tumeurs.

ED BSB : Biotechnologies, Cancérologie

Unité de recherche :

INSERM UMR 1037 Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse

Directeur(s) de Thèse :

Dr. Nathalie ANDRIEU-ABADIE

Pr. Mona DIAB-ASSAF

Rapporteurs :

Pr. Bertrand LIAGRE

Pr. Georges HILAL

Pr. Hervé LE STUNFF

Autre(s) membre(s) du jury :

Pr. Rania AZAR (PU, UL Faculté de Pharmacie, Beirut): Co-encadrant

Pr. Nina SAADALLAH-ZEIDAN (PU, UL Faculté de Santé Publique, Beirut): Examineur

Pr. Thierry LEVADE (PU-PH, INSERM UMR 1037, Toulouse): Examineur

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

*Aux Professeurs **Bertrand Liagre**, **Georges Hilal**, et **Hervé Le Stunff** je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail en tant que rapporteurs.*

*Aux Professeurs **Nina Saadallah Zeidan** et **Thierry Levade**, je vous remercie d'avoir accepté d'examiner mon rapport de thèse.*

A mes directrices de thèse,

*Un grand merci très sincère à toi **Nathalie** pour la confiance que tu m'as accordée, et les heures que tu as consacrées à diriger cette thèse. J'ai beaucoup apprécié ta rigueur scientifique, ainsi que tes qualités humaines d'écoute, et de compréhension. Tu m'as appris d'être méticuleuse, de travailler en silence, et de persévérer.*

*Toute ma reconnaissance et ma gratitude vont à toi **Mona** pour l'opportunité de vie que tu m'as offerte. Je te remercie de m'avoir soutenue durant les moments les plus durs de ma thèse. J'ai trouvé en toi une motivation exceptionnelle et une franchise à toute épreuve. Ton esprit pédagogue et maternel garantit le succès à tes étudiants.*

*Et enfin mes plus vifs remerciements à toi **Rania** pour avoir accepté de co-encadrer cette thèse. Merci pour tes remarques pertinentes et merci de m'avoir donné l'envie de me dépasser.*

Aux membres de l'équipe Levade - Andrieu,

*A vous **Thierry** vont mes sentiments de gratitude pour m'avoir accueilli dans votre équipe. J'ai trouvé en vous la gentillesse ultime et une référence scientifique illimitée.*

***Céline** un grand merci pour tes idées enrichissantes, pour le coup de main et l'optimisme que tu m'as transmis. **Hervé** et **Bruno** merci pour votre soutien, et merci d'avoir mis votre expérience à ma disposition. **Fred** merci pour ta sympathie et ton sourire agréable.*

*Merci à toi et à **Nicole** pour ton amabilité et le coup de main précieux apporté durant les manip souris les plus lourdes. **Steph** merci pour les manip de radioactivité, et pour l'encouragement continu que tu m'as apporté. **Virginie** je te remercie d'avoir été une collègue de bureau très sympa, et d'avoir nourri mon sens de responsabilité. **Patricia**, merci pour ta gentillesse et ton aide discrète.*

*Aux post-docs **Florie** et **Guillaume**, merci d'avoir donné l'exemple du vrai chercheur, je vous souhaite une carrière qui convient à votre passion pour la recherche.*

*Aux doctorants que j'ai connus durant ma thèse, au duo **David** - **Julia** merci pour les blagues, les fous rires allègres et les astuces que vous m'avez apprises. **Caroline** et **Justine** merci de votre présence à mes côtés, et de votre soutien continu, je vous souhaite bon courage pour la suite. **Maxime** et **Michael**, merci de votre présence brève mais remarquable. **Claire** merci d'avoir amorcé le projet, et **Léo** merci de ton aide durant mes soucis de santé. Je remercie également les stagiaires qui ont contribué à la bonne ambiance du labo et en particulier **Silvia** pour toutes nos belles discussions, et pour la dégustation des meilleurs plats de pasta!*

*Pour mes compatriotes au labo **Fatima** et **Nathalie**, je n'oublierai jamais les moments et les repas partagés ensemble! Merci de votre amitié inestimable et de votre esprit gracieux qui m'a aidée à me déconnecter des soucis quotidiens.*

Aux membres des centres CRCT et I2MC

*Au personnel des plateformes, merci de votre gentillesse et disponibilité, et merci de m'avoir formée. Pour la biomol je remercie **Frédéric**, **Jean José** et **Nathalie**, pour la cytométrie je remercie **Alexia**, **Christiane** et **Manon**, et pour la lipidomique je remercie **Aude** et **Justine**.*

*Aux compatriotes que j'ai rencontrés au centre, **Assala**, **Darine**, **Rana**, **Sadek** et **Mouin**, merci de votre soutien le long de ce défi. Je vous souhaite tout le bonheur ainsi une carrière qui convient à vos ambitions.*

A mes amis

***Jad**, **Sabina**, **Bernard**, **Bendy** et son épouse **Céline**, **Sabine**, **Céline**, **Anthony**, **Hicham**, **Jean**, **Mario**, **Rouba**, et **Gaby** je vous remercie de tout mon cœur de votre soutien, votre bonne humeur, et votre aide précieuse dans les moments les plus difficiles. Je vais garder en mémoire tous les moments agréables passés ensemble.*

*Merci à tous ceux que j'ai rencontrés durant mon engagement paroissial en particulier **Père Nabil**, **Pierre Blanchard**, **Lucie Ribère** et tous les membres de la chorale. Merci pour l'ambiance de partage, de joie et d'allégresse. Je remercie **Père Elias El Helou** pour sa présence depuis les années scolaires à mes côtés, merci pour ton encouragement incessant.*

*Merci à tous les amis qui m'ont accueillie hors Toulouse, et en particulier mon amie **Nadia** pour son accueil chaleureux et exceptionnel à Bordeaux.*

A ma famille

*A ma famille Toulousaine, mes très chers **Rita, Max, Simon, et Jean-Baptiste**, un merci ne suffit pas pour exprimer ma reconnaissance. Je n'oublierai jamais les moments les plus sereins ainsi que les moments les plus difficiles que nous avons partagés ensemble. Vous m'avez comblée de joie par votre accueil chaleureux, votre amour et affection.*

C'est également avec émotion que je souhaite remercier tous les miens...

*Une pensée profonde à l'âme de mes **papis**, j'espère que vous êtes fiers de moi...*

*Je remercie mes **mamis** qui n'ont pas toujours compris dans quoi j'étais embarquée. Merci de m'avoir toujours soutenue et encouragée. Vous êtes mes racines et ma destination de prédilection où je trouve la douceur et l'amour suprême.*

***Papa, Maman**, je ne saurais jamais vous exprimer toute la fierté que j'ai de vous avoir comme parents. Merci d'avoir été mes premiers fans, et de m'avoir accordé une attention et une confiance exceptionnelles depuis la première seconde de ma vie. Je n'oublierai jamais les nuits que vous avez passées à veiller sur ma morale, ma santé et mes études. Merci de votre sacrifice, amour, réconfort et soutien inconditionnel. Sans vous, je n'aurai jamais pu faire tout ça!*

*Mes deux frères **Mrad et Elie**, et ma sœur **Christine** je vous remercie d'avoir fait toute cette aventure avec moi malgré toutes les circonstances. Merci de m'avoir motivée et comblée d'affection durant les moments de doute et de faiblesse... Merci d'avoir suivi mon exemple, je suis fière de vous! **Mrad**, bon courage pour ta thèse en physique, **Kiki** je te souhaite un très bon parcours vers une thèse en chimie, et **Lello** on verra bien si tu choisiras les maths ;) Je vous aime tant mes futurs docteurs!*

*Je termine par te remercier mon fiancé et mon très cher compagnon **Elie**, ton arrivée sur ma route a définitivement changé le cours de ma vie. Merci pour ta tendresse, ton écoute, ta patience, ton aide morale et logistique, merci pour les conseils constructifs que tu m'as apportés durant ces trois années de thèse notamment les derniers mois de rédaction. Je remercie également **ta famille** qui a montré un soutien continu et un soin incontestable, merci d'être ma deuxième famille. Mon amour, cette thèse est la nôtre, et sa fin annonce une nouvelle étape pour nous deux. J'ai hâte de découvrir ce qui nous attend!*

*Enfin je te remercie mon **DIEU** de m'avoir donné toutes ces grâces d'amour, de famille et de réussite. Je te remercie d'avoir mis dans ma vie tous les gens que j'ai cités.*

Marguerite

À Papa, Maman,

Mrad, Christine, Elie

Et mon fiancé Elie

ABSTRACT

Melanoma infiltration by macrophages (TAM) is often correlated with poor prognosis. However, the mechanisms that regulate the recruitment and function of these cells remain poorly understood. Recent studies have shown a major role of tumor sphingosine kinase 1 (SK1), the enzyme that produces sphingosine-1-phosphate (S1P), in tumor stroma remodeling. The aim of this project was to investigate the role of tumor SK1 on the inflammatory microenvironment, particularly macrophages, during the development of melanoma.

In vitro, we showed that the inhibition of SK1 in melanoma cells: 1) blocks macrophage migration. Conversely, overexpression of this kinase in tumor cells stimulates the migration of inflammatory cells. This effect is dependent on S1P binding to its receptors (S1PR) on the macrophage surface; 2) reduces the secretion of TGF- β and 3) stimulates macrophage differentiation towards an antitumor M1 phenotype. The latter phenomenon does not depend on S1P nor S1PRs, but on the secretion of TGF- β by tumor cells. Indeed, macrophage differentiation can be reversed by adding recombinant TGF- β in the tumor cell-conditioned medium.

In vivo, our results showed that orthotopic injection, *i.e.* intradermal, of murine melanoma cells invalidated for SK1 in C57BL / 6 syngenic mice was associated with a reduction in tumor growth compared to mice having received control melanoma cells. Furthermore, the invalidation of tumor SK1 leads to a significant increase in the expression of anti-tumor cytokines and a Th1 polarization within the tumor. This phenomenon is accompanied by a reduction in the percentage of CD206⁺MHCII^{low} M2 macrophages, and conversely, an increase in the percentage of M1 macrophages CD206⁻MHCII^{high} as well as CD4⁺ and CD8⁺ cells infiltrated into the tumor.

These results suggest a key role of tumor SK1 in the recruitment of macrophages and their polarization in melanoma. Thus, the axis SK1 / TGF- β could be a promising therapeutic target in controlling the growth of this tumor.

RÉSUMÉ

L'infiltration des mélanomes par les macrophages (TAM) est souvent corrélée à un mauvais pronostic. Cependant, les mécanismes qui régulent le recrutement et la fonction de ces cellules restent encore mal compris. Des études récentes ont montré un rôle majeur de la sphingosine kinase 1 (SK1) tumorale, l'enzyme qui produit la sphingosine-1-phosphate (S1P), dans le remodelage du stroma associé à la tumeur. Le but de ce projet a été d'étudier le rôle de la SK1 tumorale sur le microenvironnement inflammatoire, et en particulier les macrophages, lors du développement des tumeurs mélaniques.

In vitro, nous avons montré que l'inhibition de SK1 dans les cellules de mélanome : 1) bloque la migration des macrophages. A l'inverse, la surexpression de cette kinase dans les cellules tumorales stimule la migration des cellules inflammatoires. Cet effet est dépendant de la S1P et de sa fixation sur les récepteurs S1PR présents à la surface des macrophages ; 2) réduit la sécrétion de TGF- β et 3) stimule la différenciation des macrophages vers un phénotype M1 antitumoral. Ce phénomène n'est pas dépendant de la S1P, ni des S1PRs, mais de la sécrétion de TGF- β par les cellules tumorales. En effet, la différenciation macrophagique peut-être réversée par l'addition de TGF- β recombinant dans le milieu de sécrétion des cellules tumorales.

In vivo, nos résultats montrent que la greffe orthotopique, i.e. intradermique, de cellules de mélanome murin invalidées pour la SK1 à des souris syngéniques C57BL/6 est associée à une réduction de la croissance tumorale, comparée à des souris ayant reçu des cellules de mélanome contrôles. De plus, l'inactivation de la SK1 tumorale conduit à une augmentation significative de l'expression de cytokines anti-tumorales ainsi qu'à une polarisation Th1 au sein de la tumeur. Ce phénomène s'accompagne d'une réduction du pourcentage de macrophages M2 CD206⁺MHCII^{low}, et à l'inverse, d'une augmentation du pourcentage de macrophages M1 CD206⁻MHCII^{high} ainsi que de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ infiltrés dans la tumeur.

Ces résultats suggèrent un rôle clé de la SK1 tumorale dans le recrutement et la polarisation des macrophages dans les mélanomes. Ainsi, l'axe SK1/ TGF- β pourrait constituer une cible thérapeutique prometteuse dans le contrôle de la croissance de cette tumeur.

SOMMAIRE

ABSTRACT	7
RÉSUMÉ	8
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	16
LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES	26
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	28
I. Le mélanome	29
1- Définition et épidémiologie: Cancer rare mais très agressif	29
1.1- Les mélanocytes	29
1.2- Définition du mélanome	31
1.3- Épidémiologie du mélanome	31
1.4- Facteurs de risque du mélanome	32
1.4.1- MC1R et exposition aux rayons ultraviolets	32
1.4.2- Phototype de l'individu	33
1.4.3- Nævi (grains de beauté) préexistants	34
1.4.4- Immunosuppression	34
1.4.5- Histoire personnelle de cancer pendant l'enfance	34
1.4.6- Histoire familiale (facteurs génétiques)	34
1.5- Diagnostic du mélanome	35
1.5.1- Examen clinique à l'œil nu	35
1.5.2- Dermoscopie	35
1.5.3- Photographies du corps entier (PCE)	36
1.5.4- Microscopie confocale in vivo	36
2- Physiopathologie: progression du mélanome	37
2.1- Modèle de Clark	37
2.1.1- Hyperplasie et formation d'un nævus bénin	37
2.1.2- Cytologie atypique et formation d'un nævus dysplasique	37
2.1.3- Phase de croissance radiale	37
2.1.4- Phase de croissance verticale	38
2.1.5- Mélanome métastatique	38
2.2- Voies de signalisation du mélanome et altérations moléculaires	39

2.2.1-	Voies de prolifération et de survie	40
2.2.1.1-	RAS/RAF/MEK/ERK.....	40
2.2.1.2-	PTEN et AKT	41
2.2.2-	Cycle cellulaire	41
2.2.2.1-	CDKN2A	42
2.2.2.1.1-	INK4A:	42
2.2.2.1.2-	ARF:	42
2.2.2.2-	Cycline D1 (CD1).....	43
2.2.3-	Facteurs de transcription et régulateurs épigénétiques.....	44
2.2.3.1-	Facteur de transcription associé à la microphthalmie (MITF).....	44
2.2.3.2-	Régulateurs épigénétiques.....	45
3-	Thérapies ciblant les cellules du mélanome	46
3.1-	Chirurgie.....	46
3.2-	Chimiothérapie.....	47
3.3-	Thérapie ciblée	48
3.3.1-	Inhibiteurs de BRAF.....	48
3.3.1.1-	Sorafénib	48
3.3.1.2-	Vémurafénib (Zelboraf ®)	49
3.3.1.3-	Dabrafénib (Tafinlar®)	50
3.3.2-	Inhibiteurs de MEK.....	51
3.3.3-	Inhibiteurs de cKIT	52
II.	Microenvironnement du mélanome	53
1-	Composantes du stroma tumoral et rôle dans l'invasion et la dissémination du mélanome	53
1.1-	La matrice extracellulaire	53
1.1.1-	Les intégrines.....	54
1.1.2-	Les facteurs de croissance	54
1.1.3-	Le collagène	55
1.1.4-	L'élastine.....	55
1.1.5-	Les Protéoglycanes.....	56
1.1.6-	Les laminines	57
1.1.7-	L'ostéopontine	57
1.1.8-	L'ostéonectine.....	57

1.1.9-	La ténascine C	58
1.1.10-	CCN3.....	58
1.1.11-	Les métalloprotéinases matricielles (MMP)	59
1.2-	La composante cellulaire.....	60
1.2.1-	Les kératinocytes.....	60
1.2.2-	Les fibroblastes.....	61
1.2.3-	La vascularisation et l'angiogenèse	62
1.2.3.1-	Les cellules endothéliales :	62
1.2.3.2-	Les péricytes :.....	62
1.2.4-	Les cellules inflammatoires et immunocompétentes	63
1.2.4.1-	Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC)	65
1.2.4.2-	Les cellules dendritiques (DC).....	66
1.2.4.3-	Les neutrophiles.....	68
1.2.4.4-	Les cellules natural killer (NK).....	69
1.2.4.4.1-	NKG2D et mélanome	71
1.2.4.4.2-	Récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR) et mélanome	72
1.2.4.4.3-	DNAM-1 et mélanome	73
1.2.4.5-	Les cellules natural killer T (NKT)	73
1.2.4.6-	Les monocytes / macrophages.....	75
1.2.4.6.1-	Recrutement et migration des monocytes / macrophages	75
	□ Facteurs solubles permettant le recrutement des monocytes vers la tumeur	76
	□ Composants de l'ECM contrôlant le recrutement des macrophages.....	76
	□ Recrutement des macrophages dans les zones hypoxiques.....	77
1.2.4.6.2-	Polarisation des macrophages	77
	□ Déterminants moléculaires de la polarisation des macrophages.....	78
	□ Polarisation des macrophages et cancer	80
	- Promotion de l'angiogenèse tumorale par les macrophages.....	81
	- Promotion de l'invasion et des métastases tumorales par les macrophages...	82
	- Contribution des macrophages à la formation de la niche pré-métastatique	83
	- Immunosuppression du microenvironnement tumoral médiée par les TAM	83
	- TAM , cellules souches du cancer et résistance chimiothérapeutique	84
1.2.4.7-	Les lymphocytes	85

1.2.4.7.1-	Les lymphocytes T auxiliaires (Th)	85
□	Les lymphocytes Th1.....	86
□	Les lymphocytes Th2.....	86
□	Les lymphocytes Th17.....	86
□	Les lymphocytes Treg	87
□	Les lymphocytes Th9.....	87
□	Les lymphocytes Th22.....	88
□	Plasticité des lymphocytes Th et cancer.....	88
1.2.4.7.2-	Les lymphocytes T cytotoxiques (Tc ou CTL)	90
1.2.4.7.3-	Les lymphocytes T $\gamma\delta$	91
1.2.4.7.4-	Les lymphocytes B.....	92
1.2.4.8-	Molécules immunosuppressives du microenvironnement tumoral	93
1.2.4.8.1-	L'Interleukine 10 (IL-10).....	93
1.2.4.8.2-	L'IL-6 et l'IL-1 β	94
1.2.4.8.3-	Transforming Growth Factor- β (TGF- β).....	95
□	Signalisation du TGF- β	95
□	Immunosuppression, inflammation et cancer	96
2-	Thérapies ciblant le microenvironnement tumoral : efficacité et résistance	98
2.1-	Ciblage de la matrice extracellulaire.....	98
2.2-	Ciblage de l'angiogenèse tumorale	98
2.3-	L'immunothérapie	100
2.3.1-	Les anti-CTLA-4	101
2.3.2-	Les anti-PD-1/PD-L1.....	102
2.3.3-	Les cytokines.....	105
2.3.4-	Transfert adoptif de lymphocytes T	106
2.3.5-	Transfert adoptif de cellules NK.....	107
2.3.6-	Immunothérapie à base de cellules dendritiques	108
2.3.7-	Ciblage des macrophages associés aux tumeurs.....	109
2.3.8-	Ciblage de TGF- β	110
III.	Les Sphingolipides	112
1-	Généralités	112
2-	Métabolisme du céramide en sphingosine-1-phosphate	114
2.1-	Anabolisme de la S1P.....	115

2.1.1-	Structure et isoformes des sphingosine kinases	115
2.1.2-	Rôles physiologiques des sphingosine kinases	116
2.1.3-	Modes d'activation des sphingosine kinases	118
2.1.4-	Localisation subcellulaire des sphingosine kinases	118
2.2-	Catabolisme de la S1P.....	119
2.2.1-	Sphingosine-1- phosphate lyase (SPL)	119
2.2.1.1-	Structure protéique et topologie de la SPL	119
2.2.1.2-	Distribution tissulaire de la SPL	120
2.2.1.3-	SPL, apoptose et cancer.....	120
2.2.1.4-	Régulation de la SPL.....	121
2.2.2-	Sphingosine-1- phosphate phosphatase (SPP)	122
3-	Signalisation par la S1P.....	123
3.1-	L'activité intracellulaire de la S1P	124
3.1.1-	Histones désacétylases (HDAC)	124
3.1.2-	Facteur associé au récepteur du TNF (TRAF2)	124
3.1.3-	Protéine Kinase C δ (PKC δ)	124
3.1.4-	Prohibitine 2 (PHB2)	125
3.2-	L'activité extracellulaire de la S1P.....	125
3.2.1-	S1P1/EDG-1.....	126
3.2.2-	S1P2/EDG-5/AGR16/H218.....	127
3.2.3-	S1P3/EDG-3.....	128
3.2.4-	S1P4/EDG-6.....	128
3.2.5-	S1P5/EDG-8/NRG-1.....	129
4-	S1P et système immunitaire	130
4.1-	S1P et neutrophiles.....	130
4.2-	S1P et cellules dendritiques (DC)	130
4.3-	S1P et mastocytes	131
4.4-	S1P et macrophages	132
4.5-	S1P et lymphocytes.....	133
4.6-	S1P et réseau de cytokines.....	135
4.6.1-	TNF- α	136
4.6.2-	TGF- β	136
5-	S1P et cancer (Figure 26).....	137

5.1-	Transformation oncogénique et croissance tumorale.....	137
5.2-	Migration des cellules tumorales	138
5.3-	Angiogenèse tumorale.....	139
5.4-	Réponse inflammatoire.....	140
5.5-	Résistance aux chimiothérapies	140
6-	Ciblage de la S1P.....	141
6.1-	Agonistes et antagonistes des récepteurs à la S1P	141
6.1.1-	FTY720 (Fingolimod, ou Gilenya™).....	141
6.1.2-	KRP-203.....	143
6.1.3-	SEW 2871.....	143
6.1.4-	JTE 013	143
6.1.5-	VPC 23019	144
6.2-	Anticorps monoclonal anti-S1P	144
6.3-	Inhibiteurs de la sphingosine kinase.....	145
	OBJECTIF GÉNÉRAL DE LA THÈSE	147
	MATÉRIELS & MÉTHODES	148
I-	Culture cellulaire et production de milieux conditionnés.....	149
II-	Isolement et culture de macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris (BMDM)	150
III-	Transfection cellulaire	150
IV-	Essai de motilité in vitro	151
V-	RT-PCR quantitative.....	151
VI-	Analyse des lipides par spectrométrie de masse.....	152
VII-	Mesure de l'activité enzymatique SK1.....	152
VIII-	ELISA du TGF-β1	153
IX-	Bioinformatique	153
X-	Greffes orthotopiques de mélanome chez la souris.....	153
XI-	Analyse des leucocytes infiltrant les tumeurs	154
XII-	Analyses statistiques	154
	RÉSULTATS.....	155
I-	Étude du rôle de la sphingosine kinase 1 du mélanome dans l'infiltrat immunitaire de la tumeur et la progression du cancer	157
1-	Introduction.....	157
2-	Résultats:	159

3- Discussion.....	187
II- Étude du rôle de la sphingosine kinase 1 de l'hôte dans l'infiltrat immunitaire de la tumeur et la progression tumorale.....	190
1- Introduction.....	190
2- Résultats.....	191
3- Discussion.....	195
CONCLUSION & PERSPECTIVES	197
I- Conclusion générale	198
II- Perspectives	200
1- Régulation de l'expression des enzymes du métabolisme de la S1P dans les cellules de mélanome	200
2- Sécrétion de la S1P	201
3- Signalisation induite par la S1P dans les macrophages.....	202
4- Effet des inhibiteurs pharmacologiques de la SK1 sur l'infiltrat immunitaire et la croissance tumorale in vivo.	202
5- Effet du TGF- β 1 sur la réponse immune in vivo.....	203
6- Régulation de l'expression de TGF- β 1 par la SK1.....	203
7- L'effet de la SK1 du macrophage sur les cellules du mélanome	204
ANNEXE1: Chapitre de livre	205
ANNEXE 2: Revue.....	223
RÉFÉRENCES.....	236

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADCC: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

ADM: Adrénomédulline

AKT: Protéine kinase B

AMP: Adénosine monophosphate

AP-1: Activator protein 1

APC: Allophycocyanin

APC: Antibody presenting cell

ARF: Alternative reading frame

ARG: Arginase

ARID: AT-rich interactive domain-containing protein

ARN: Acide ribonucléique

ATCC: American type culture collection

ATF2: Activating transcription factor 2

ATP: Adénosine triphosphate

BAD: Bcl-2-associated death promoter

BCL-2: B-cell lymphoma 2

bFGF: Basic fibroblast growth factor

BMDM: Bone marrow-derived macrophage

BTLA: B- and T-lymphocyte attenuator

C57BL/6: C57 black 6

CAF: Cancer-associated fibroblasts

CAR: Chimeric antigen receptor

CCL: Chemokine (C-C motif) ligand

CCN3: Connective tissue growth factor (CTGF), Cystein rich protein (Cyr61), and Nephroblastoma overexpressed gene (nov) 3

CCR: Chemokine (C-C motif) receptor

CD: Cluster of differentiation

CD40L: Cluster of differentiation 40 ligand

CDK: Cyclin dependent kinase

Cer: Céramide

Chi3l3: chitinase 3-like 3

CHO cells: Chinese hamster ovary cells

CKI: Cyclin-dependent kinase inhibitor

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

CoA: Coenzyme A

COX-2: Cyclooxygénase-2

CSC: Cellules souches du cancer

CSF-1: Colony stimulating factor 1

CSF-1R: Colony stimulating factor 1 receptor

Ct: Threshold cycle

CTL: Cytotoxic T lymphocytes

CTLA-4: Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4

CXCL: Chemokine (C-X-C motif) ligand

CXCR2: Chemokine (C-X-C motif) receptor

DC: Dendritic cells

DEC1: Deleted in esophageal cancer 1

DHS: Dihydrospingosine

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

DMS: Diméthylsphingosine

DNAM-1: DNAX accessory molecule-1

DNase: Deoxyribonuclease

ECM: Extracellular matrix

EDG: Endothelial differentiation gene

EDP: Elastin-derived peptides

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EGF: Epidermal growth factor

EgTA: Ethylene glycol tetra acetic acid

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

EMA: European medicines agency

EMAPII: Endothelial monocyte-activating polypeptide-II

Eph-A: Ephrin-A

ERK: Extracellular signal regulated kinase

ETS: E26 transformation specific

Fc γ R: Fc (Fragment, crystallizable) gamma receptor

FDA: Food and drug administration

FGF: Fibroblast growth factor

FITC: Fluorescein isothiocyanate

FKHR: Forkhead transcription factor

FOXP3: Forkhead box P3

FR β : Folate receptor beta

G418: Geneticin

G-CSF: Granulocyte-colony stimulating factor

GFP: Green fluorescent protein

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

Gr1: Granulocyte-differentiation antigen

GSL: Glycosphingolipides

GTPase: Guanosine triphosphatase

HA: Acide hyaluronique

HDAC: Histones désacétylases

HEV: High endothelial venules

HGF: Hepatocyte growth factor

HIF1 α : Hypoxia-inducible factor 1-alpha

HLA: Human leukocyte antigen

HMB-45: Human melanoma black 45

HRE: Hormone response element

HUVEC: Human umbilical vein endothelial cells

IC: Immune complex

IDO: Indoléamine 2,3-dioxygénase

IFN- γ : Interferon gamma

Ig: Immunoglobulin

IGF1: Insulin-like growth factor 1

IL: Interleukin

INK4A: Inhibitor of cyclin-dependent kinase type 4

iNOS: Inducible nitric oxide synthase

IP3: Inositol triphosphate

IRF5: Interferon regulatory factor

ITAM: Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM: Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
JMJD3: Jumonji domain containing 3
JNK: c-Jun N-terminal kinase
kDa: Kilodalton
KIR: Killer Ig-like receptors
KLF2: Facteur Krüppel-like 2
KO: Knock-out
LAG3: Lymphocyte-activation gene 3
LBP1: Lipopolysaccharide binding protein 1
LOX: Lysyl oxydase
LPA: Lysophosphatidic acid
LPP: Lipid phosphate phosphohydrolase
LPS: Lipopolysaccharide
Ly6: Lymphocyte antigen 6
MAGE: Melanoma-associated antigen
MAPK: Mitogen activated protein kinase
MART: Melanoma associated antigen recognized by T cells
MC1R: Melanocortin 1 receptor
MCF-7: Michigan cancer foundation-7
MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor
MDM2: Mouse double minute 2
MDSC: Myeloid-derived suppressor cells
MEK: Mitogen-activated protein kinase kinase

MEL-5: Melanoma 5

MGMT: O6-méthylguanine-DNA méthyltransférase

MHCII: Major histocompatibility complex

MIC: MHC class I chain-related gene

MIP-1 α : Macrophage inflammatory protein 1 alpha

miR: microRNA

MITF: Microphthalmia-associated transcription factor

MMP: Matrix metalloproteinase

MRC1: Mannose receptor, C type 1

MT1-MMP: Membrane type 1-matrix metalloproteinase 1

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NCR: Natural cytotoxicity receptor

NF1: Neurofibromatosis type 1 protein

NF-kB: Nuclear factor kappa beta

NK: Natural killer cell

NKT: Natural killer T cell

NO: Nitric oxide

NRAS: Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog

OMS: Organisation mondial de la santé

OPN: Osteopontin

ORMDL3: ORM1-like 3

PBMC: Peripheral blood mononuclear cells

PBS: Phosphate buffered saline

PCE: Photographies du corps entier

PCR: Polymerase chain reaction

PD-1: Program death 1

PDGF: Platelet derived growth factor

PD-L1: Program death ligand 1

PE-Cy7: Phycoerythrin cyanin 7

PES: Polyethersulfone

PFS: Progression-free survival

PGE2: Prostaglandin E2

PHB2: Prohibitine 2

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

PIP3: Phosphatidylinositol

PKB: Protein kinase B (AKT)

PKC: Protéine kinase C

PLC: Phospholipase

PLC β : Phospholipase beta

PMA: Phorbol myristate acetate

PMSF: Phenylmethanesulfonyl fluoride

POMC: Proopiomelanocortin

PP2A: Protein phosphatase 2 A

PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

RANTES: Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted

Rb: Retinoblastoma protein

RE: Réticulum endoplasmique

Retnla: Résistine-like α

RIP1: Receptor-interacting protein 1

RNase: Ribonuclease

ROR: Retinoid-related orphan receptor

ROS: Reactive oxygen species

RPMI: Roswell park memorial institute medium

RTK: Receptor tyrosine kinase

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction

S1P: Sphingosine 1-phosphate

S1PR: Sphingosine 1-phosphate receptor

SAPK: Stress activated protein kinase

SCF: Stem cell factor

SF: Scatter factor

SGPL1: Sphingosine-1-phosphate lyase 1 gene

shRNA: Short hairpin RNA

siRNA: Small interfering RNA

SK: Sphingosine kinase

SKI-I: Sphingosine kinase inhibitor

SL: Sphingolipides

SM: Sphingomyéline

SMAD: SMA/MAD (small body size/ mothers against decapentaplegic)

SOCS: Suppressor of cytokine signalling

SPARC: Secreted protein acidic and rich in cysteine

SPC: Sphingosine phosphorylcholine

Sph: Sphingosine

SphK: Sphingosine kinase

SPL: S1P lyase

SPNS2: Spinster Homolog 2

SPP: Sphingosine phosphate phosphatase

SPT: Sérine palmitoyl transférase

STAT: Signal transducer and activator of transcription

SUMO: Small ubiquitin like modifier

SVF: Sérum de veau foetal

SWI/SNF: Switch/sucrose non-fermentable

TAF: Tumor associated fibroblast

TAK1: Transforming growth factor-beta-activated kinase 1

TAM: Tumor associated macrophage

TAN: Tumor associated neutrophil

TCR: T cell receptor

TGF- β R/ T β R: Transforming growth factor beta receptor

TGF- β : Transforming growth factor beta

Th: T helper

Thy1: Thymus cell antigen 1, theta

TIE: Tunica interna endothelial cell kinase

TIM3: T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3

TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinases

TLR: Toll-like receptor

TNC: Tenascin C

TNF-R: Tumor necrosis factor alpha receptor

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

TRAF: TNF receptor-associated factor

TRAIL: TNF related apoptosis-inducing ligand

Transporteurs ABC: Transporteurs à ATP binding cassette

Treg: Regulatory T cell

TRP: Tyrosinase related protein

UHPLC: Ultra-high performance liquid chromatography

ULBP: UL16-binding protein

uPA: Urokinase plasminogen activator

UV: Ultra violet

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

WT: Wild type

α -MSH: Alpha-Melanocyte-stimulating hormone

α -SMA: Alpha-smooth muscle actin

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

TABLEAUX :

Tableau 1	Résumé des nouvelles technologies utilisées dans la détection du mélanome	36
Tableau 2	Voies de signalisation du mélanome et altérations moléculaires correspondantes	39
Tableau 3	Essais cliniques des agents ciblant le microenvironnement du mélanome	99
Tableau 4	Résultats des essais cliniques des immunothérapies dans le mélanome	109
Tableau 5	Récapitulatif des différentes molécules inhibitrices de TGF- β en développement préclinique	111

FIGURES

Figure 1	Anatomie de la peau et effecteurs cellulaires	30
Figure 2	Rayonnement UV: bronzage et carcinogenèse	33
Figure 3	Critères de détection du mélanome	35
Figure 4	Évènements biologiques et changements moléculaires durant la progression du mélanome	38
Figure 5	Voies de signalisation dans le cas normal (a) et dans le mélanome (b)	43
Figure 6	Différenciation mélanocytaire: l'axe MITF	45
Figure 7	Une variété de cellules stromales soutient la formation d'une niche tumorale primaire	60
Figure 8	Relation entre les aspects cellulaires intrinsèques et extrinsèques de la progression tumorale	64
Figure 9	Mécanismes d'immunosurveillance (gauche) et d'échappement immunitaire (droite) des DC dans le cancer	67
Figure 10	La reconnaissance des cellules tumorales par les cellules NK	70
Figure 11	L'activité anti-tumorale des cellules NKT	74
Figure 12	Mécanismes de polarisation des macrophages	80
Figure 13	Promotion de la progression tumorale par les TAM	81
Figure 14	Différentes sous-populations de lymphocytes T auxiliaires présentes dans le microenvironnement tumoral	89
Figure 15	Orchestration des macrophages associés aux tumeurs (TAM) par les lymphocytes B	93
Figure 16	Schéma des voies canonique (gauche) et non canonique (droite) de la signalisation TGF- β	96
Figure 17	Effets du TGF- β sur les cellules du système immunitaire	97
Figure 18	Régulation de la réponse immunitaire par les points de contrôle immunitaire	100
Figure 19	Immunothérapie par transfert adoptif de cellules	107

Figure 20	Représentation schématique des approches thérapeutiques bloquant la signalisation TGF- β	110
Figure 21	Structure (a) et biosynthèse <i>de novo</i> (b) du céramide	113
Figure 22	Rhéostat Céramide (Cer)/ Sphingosine (Sph)/ Sphingosine 1-Phosphate (S1P)	115
Figure 23	Actions intracellulaires (zone rouge et verte) et extracellulaire (zone bleu) de la S1P	123
Figure 24	Activité extracellulaire de la S1P : signalisation via cinq récepteurs couplés aux protéines G	126
Figure 25	Effets de la S1P sur les fonctions des cellules immunitaires	134
Figure 26	Résumé des actions de la S1P dans le cancer	138
Figure 27	Internalisation du récepteur S1P1 après phosphorylation du FTY720 par la SK2	142
Figure 28	Evolution tumorale du mélanome et développement de la résistance aux thérapies	157
Figure 29	Host SK1 deficiency alters melanoma growth and immune infiltrate	191
Figure 30	The SK1 deficiency both in tumor cells and host reduces melanoma growth and alters lymphocyte infiltrate	193
Figure 31	Schéma récapitulant le rôle de la SK1 du mélanome dans la migration et la polarisation des macrophages, ainsi que dans la réponse immunitaire associée	199

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le mélanome

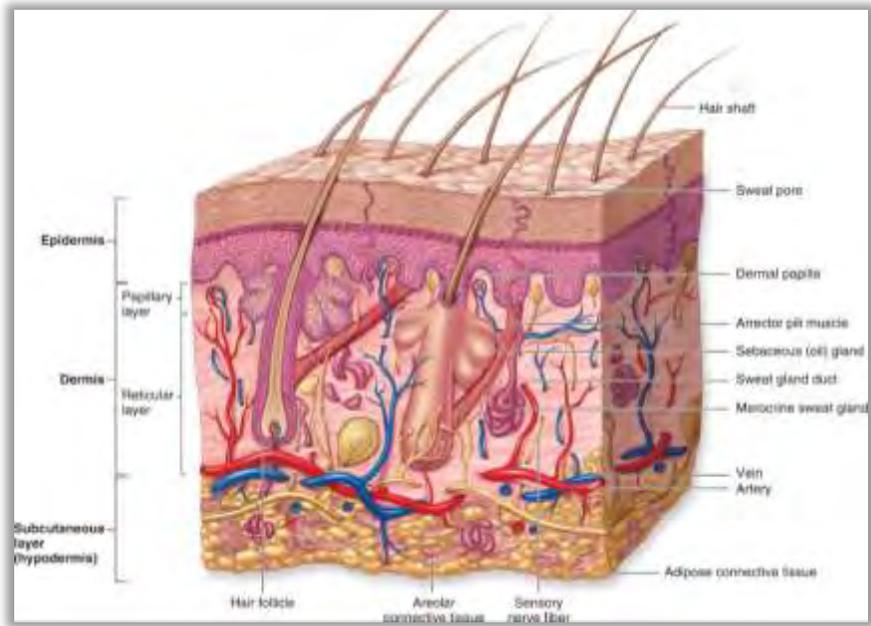
1- Définition et épidémiologie: Cancer rare mais très agressif

La peau est l'interface principale entre le corps et son environnement, elle fournit une première ligne de défense contre les agressions physiques, chimiques et biologiques. Elle maintient l'homéostasie du corps et recueille les informations sensorielles de l'environnement. La structure de la peau reflète sa complexité: (Figure 1)

- L'épiderme contient la couche basale, le stratum spinosum, le stratum granulosum et la couche cornée la plus externe qui constitue une barrière vitale. Ces couches regroupent des cellules spécialisées comme les mélanocytes, les kératinocytes, les cellules de Langerhans et des lymphocytes T principalement cytotoxiques CD8⁺.
- Le derme est constitué de collagène, du tissu élastique et de fibres réticulaires. Il contient de nombreuses cellules spécialisées, telles que les fibroblastes et les cellules immunitaires. Il comprend aussi des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que des terminaisons nerveuses.
- L'hypoderme est formé principalement de tissus conjonctif et adipeux.⁵⁶⁵

1.1- Les mélanocytes

Les mélanocytes cutanés proviennent des progéniteurs de la crête neurale qui migrent vers la peau pendant le développement embryonnaire. Dans la peau, les mélanocytes se situent dans la couche basale de l'épiderme et dans les follicules pileux. Leur homéostasie est réglée par les kératinocytes de l'épiderme.⁷⁸⁴ En réponse aux rayons ultraviolets (UVs), les kératinocytes sécrètent des facteurs qui régulent la survie, la différenciation, la prolifération, la motilité des mélanocytes ainsi que la production de mélanine par ces cellules. De ce fait, les mélanocytes jouent un rôle clé dans la protection de notre peau contre l'endommagement dû aux rayonnements UVs.²⁵⁷ Par contre, la transformation des mélanocytes est à l'origine du mélanome, la forme la plus agressive des cancers de la peau.



+

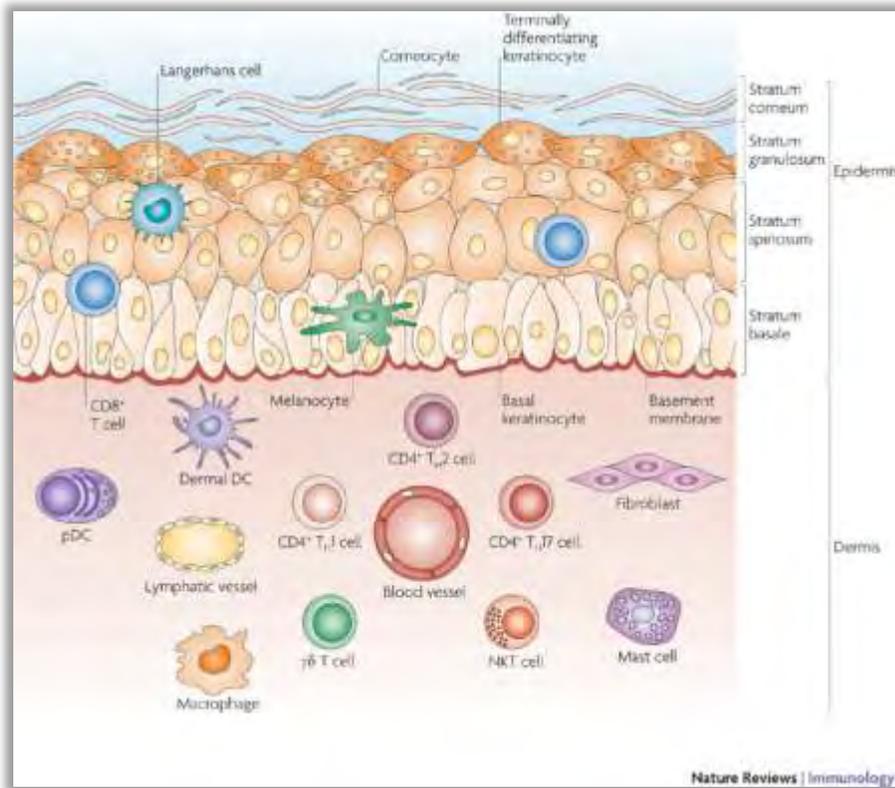


Figure 1: Anatomie de la peau et effecteurs cellulaires.⁵⁶⁵

1.2- Définition du mélanome

Le mélanome est un cancer qui surgit à partir des mélanocytes, des cellules pigmentées spécialisées dans la production de mélanine. Ce pigment confère la couleur à la peau et aux cheveux. Suivant l'emplacement des mélanocytes, on peut distinguer trois types de mélanome: le mélanome cutané qui se situe au niveau de la peau, le mélanome oculaire qui se situe au niveau des yeux, et le mélanome muqueux qui se développe au niveau de la muqueuse nasale, buccale, génitale ou anale.

1.3- Épidémiologie du mélanome

Le cancer de la peau est le troisième cancer humain le plus fréquent et son incidence mondiale augmente à un rythme alarmant. Ses formes les plus courantes sont le carcinome basocellulaire, le carcinome à cellules squameuses et le mélanome. Bien qu'il ne représente qu'environ 132000 cas sur 3 millions de cancers cutanés estimés chaque année (Organisation Mondiale de la Santé ; OMS), le mélanome est responsable de la majorité (75%) des décès par cancer de la peau.⁷³⁹ Ce cancer est de bon pronostic s'il est détecté tôt, en effet le taux de survie relative à 5 ans se situe entre 91 et 95% pour les stades localisés et chute à 15% dans les situations métastatiques.¹⁷

L'incidence du mélanome varie entre les différentes populations mondiales en étant plus élevée chez les populations à peau claire. L'Australie et la Nouvelle-Zélande montrent l'incidence la plus élevée avec ~ 60 cas rapportés par 100.000 habitants par an. Aux États-Unis le taux baisse à la moitié, alors qu'en Europe environ 20 cas par 100.000 habitants par an ont été rapportés. Cette incidence diminue notamment chez les populations à peau sombre d'Afrique et d'Asie où on signale uniquement un cas par 100.000 habitants par année.¹⁷⁸

Le mélanome présente une incidence croissante durant les dernières décennies. En effet, l'incidence de ce cancer a augmenté de 17 fois chez les hommes et de 9 fois chez les femmes aux États-Unis entre les années 1950 et 2007. Ceci est dû d'une part aux habitudes d'exposition au soleil pour de longues durées, et d'autre part aux techniques et campagnes de diagnostic qui ont évolué avec le temps ce qui permet de repérer plus de cas.²³⁰

1.4- Facteurs de risque du mélanome

Le mélanome résulte d'une combinaison de facteurs environnementaux (exposition aux UV) et génétiques (phototype de l'individu, histoire familiale...).

1.4.1- MC1R et exposition aux rayons ultraviolets

L'exposition au rayonnement UV (rayons solaires ou bronzage artificiel) est reconnue comme cancérigène pour l'homme par l'OMS.¹⁷² Le spectre des rayons UV comprenant les UVA et les UVB et a été impliqué dans la pathogenèse du mélanome.⁴⁶⁹ Le rayonnement UVB (280-315 nm) interagit avec le 7-déhydrocholestérol des kératinocytes pour en produire la vitamine D qui pénètre dans la circulation sanguine pour être métabolisée et activée dans le foie et les reins. Le rayonnement UVA (315-400 nm) produit des lésions indirectes dans l'ADN. Dans les kératinocytes, ces dommages de l'ADN activent p53, ce qui stimule la transcription de la pro-opiomélanocortine (POMC) dont le métabolisme génère deux peptides bioactifs α -MSH et β -endorphine.⁷⁴⁰ (Figure 2)

La β -endorphine circulée dans le sang s'avère responsable de la dépendance comportementale au bronzage. La α -MSH stimule le récepteur de la mélanocortine-1 (MC1R) exprimé à la surface des mélanocytes, induisant la signalisation médiée par l'AMP cyclique qui stimule le facteur de transcription MITF à induire la synthèse de la mélanine dans les mélanosomes. Ces organites sont par la suite transportés vers les kératinocytes où ils se positionnent au-dessus du noyau, du côté exposé au soleil, fournissant ainsi une certaine protection contre les dommages de l'ADN.⁷⁴⁰

Chez les personnes aux cheveux roux et / ou à la peau claire, le gène MC1R présente des polymorphismes non-fonctionnels bloquant la transduction du signal α -MSH, ce qui rend ces individus plus susceptibles aux dégâts de l'ADN.⁵¹⁰

La contribution des variantes du gène MC1R à l'apparition précoce du mélanome était inconnue jusqu'à aujourd'hui. Une étude récente basée sur le séquençage de MC1R chez 565 patients atteints de mélanome invasif comparés à des contrôles a révélé que certaines variantes de MC1R étaient des déterminants importants de l'apparition précoce du mélanome. Ces variantes étaient associées à une forte exposition au soleil pendant l'enfance.¹³³

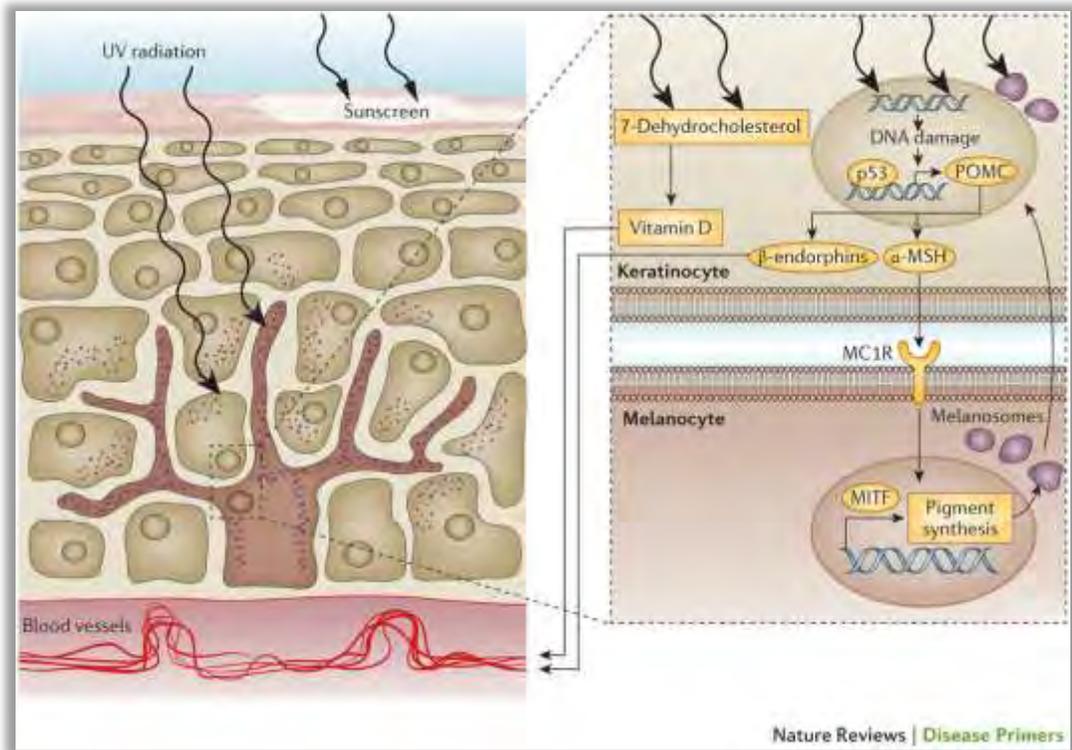


Figure 2: Rayonnement UV: bronzage et carcinogène.⁷⁴⁰

1.4.2- Phototype de l'individu

Le phototype est lié à la production de mélanine par les mélanocytes. Il existe 5 phototypes à caractéristiques définies:

- Phototype I: peau blanche, cheveux roux / blonds, yeux bleus / verts, taches de rousseur
- Phototype II: peau claire, cheveux blonds/châtains, yeux clairs à bruns, parfois apparition de taches de rousseur
- Phototype III: Peau intermédiaire, cheveux châtain / bruns, yeux bruns.
- Phototype IV: Peau mate, cheveux bruns / noirs, yeux bruns/ noirs.
- Phototype V: Peau brun foncé, cheveux noirs, yeux noirs.

Il existe deux types de mélanine: noire et rouge. Seule la noire (plus abondante chez les phototypes élevés) est protectrice vis-à-vis des UV car elle renvoie la lumière. D'où les sujets de phototype I ou II sont plus à risque de développer un mélanome que les sujets ayant naturellement une peau mate ou pigmentée.²²⁵

1.4.3- Nævi (grains de beauté) préexistants

Le fait d'avoir de nombreux grains de beauté évoque un risque subsidiaire de développement du mélanome, et en particulier si ces nævi présentent des atypies cliniques.²²⁴ Par contre la fréquence des mélanomes développés sur nævi préexistants est faible (20-30%). Les nævi les plus à risque de se transformer en mélanome malin sont les nævi congénitaux de taille supérieure à 5 cm. Ce risque est évalué entre 5 et 10%. La fréquence de transformation en mélanome malin des nævi congénitaux de petite taille est inconnue à ce jour.

1.4.4- Immunosuppression

Les receveurs de greffes d'organes subissent une immunosuppression à long terme pour éviter le rejet du greffon. Ces patients présentent un risque plus important de développement du mélanome par rapport à la population générale.⁶⁸ Par exemple les receveurs d'une transplantation rénale présentent un risque de développement du mélanome 3,6 fois plus important par rapport au reste de population non greffée.³¹²

Également dans le contexte de l'immunosuppression, Silverberg et ses collègues ont montré que l'infection par le VIH augmente la susceptibilité au développement du mélanome avec un risque relatif de 1,8.⁷⁸¹

1.4.5- Histoire personnelle de cancer pendant l'enfance

Une analyse du risque de mélanome chez des survivants d'un cancer infantile a révélé un rapport d'incidence de 2,42.⁶¹¹ L'Institut National du Cancer recommande aux adultes survivant d'un cancer développé pendant l'enfance de réaliser un examen dermatologique annuel.⁵⁶²

1.4.6- Histoire familiale (facteurs génétiques)

10 % des mélanomes malins surviennent dans un contexte familial défini comme la survenue d'au moins 2 mélanomes sur 3 générations. Certains gènes de prédisposition au mélanome ont été identifiés y compris CDKN2A, CDK4 et MC1R.²²⁵

1.5- Diagnostic du mélanome

1.5.1- Examen clinique à l'œil nu

Le mélanome est facilement auto-déTECTABLE par les patients vu qu'il est pigmenté.⁵¹² L'Asymétrie, la Bordure irrégulière, la Couleur hétérogène, et le Diamètre > 6mm (ABCD) sont des signes cliniques d'alerte pour distinguer le mélanome des grains de beauté bénins. Ces critères ont été développés dans les années 1980. Depuis lors, un E (Evolution du grain de beauté) et d'autres nouvelles approches de diagnostic ont été ajoutés.⁶⁹⁶ (Figure 3)

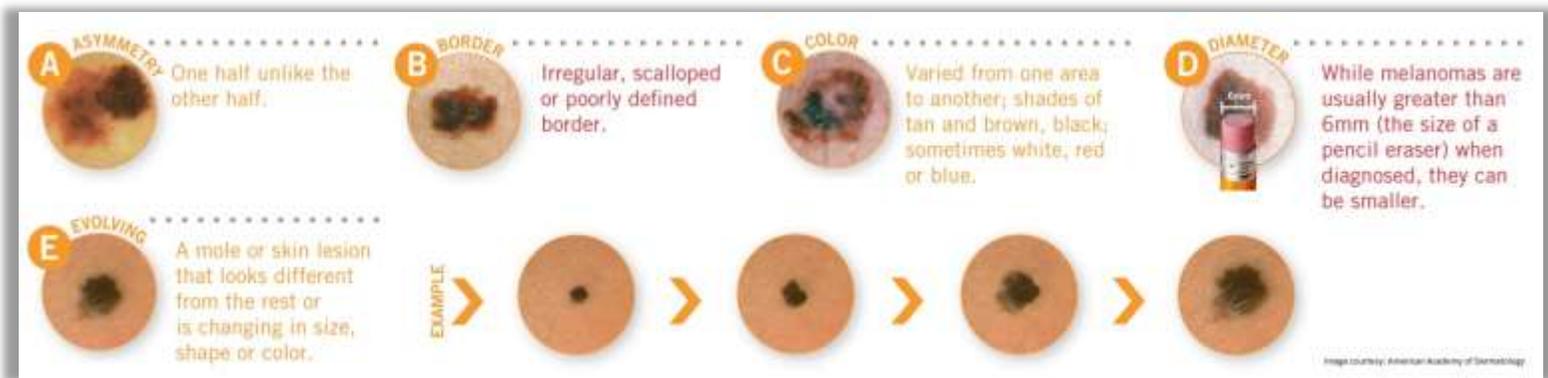


Figure 3: Critères de détection du mélanome.⁸⁵²

1.5.2- Dermoscopie

La dermoscopie est une technique d'imagerie non invasive impliquant l'utilisation d'un dispositif portable (le dermoscope) qui permet de visualiser les structures cutanées épidermiques, dermo-épidermiques et dermiques, accessibles et non accessibles à l'œil nu.^{732, 740}

Le dermoscope est constitué d'une lentille grossissante et d'une source de lumière. Il peut être couplé à un système de capture et de traitement d'image, permettant d'augmenter le grossissement obtenu de 10 fois à 20 ou 30 fois.

Les critères morphologiques pris en compte pour l'analyse de l'image dermoscopique sont: l'aspect général de la lésion (couleur et forme), la texture du réseau pigmentaire, les caractéristiques morphologiques du contour de la lésion (asymétrie) et la présence d'éléments spécifiques (pseudopodes, stries radiales). Ces critères morphologiques correspondent à des

structures anatomopathologiques spécifiques, faisant de la dermoscopie un lien entre l'examen clinique et l'examen anatomopathologique.^{520, 691} Partant de ce fait, cette technique a pu améliorer la précision du diagnostic du mélanome cutané (de 74% à 90% par rapport à l'examen visuel), évitant ainsi les biopsies inutiles de nævi bénins.⁸⁶⁸

1.5.3- Photographies du corps entier (PCE)

Cette technique est souvent utilisée chez les patients ayant un nombre élevé de nævi et / ou des nævi atypiques. Les photos sont utilisées au cours du suivi médical des patients afin d'inspecter le changement ou l'apparition de nouvelles lésions.¹⁹⁰

1.5.4- Microscopie confocale in vivo

Cette technique non invasive utilise un laser de faible puissance qui crée une image 3D des structures de l'épiderme et du derme superficiel. Elle permet d'aborder une approche plus ou moins histologique avec une sensibilité de 90% et une spécificité d'environ 86%.³⁰⁷ Ces approches de détection du mélanome ainsi que d'autres nouvelles technologies sont détaillées dans le tableau 1.

Tableau 1: Résumé des nouvelles technologies utilisées dans la détection du mélanome.⁵¹⁰

Technology	Definition	Pros	Cons	Sensitivity	Specificity	Reference
Dermatoscopy	Examination of skin with dermatoscope	Fewer biopsy specimens and removal of benign lesions	Increases examination time and requires clinician training	90%	90%	Vestergaard et al 2008
Total body photography	Series of photographs of all skin on body	Can detect thinner tumors than the naked eye and lower biopsy rates than serial dermatoscopy	Expensive	75%	74%	Drugge et al 2009
Confocal microscopy	Low power laser that creates 3-dimensional image with resolution comparable to standard histology	Able to detect subclinical disease in an area wider than that of dermatoscopy	Limited by expense and the need for specialized training	90%	86%	Hofmann-Wellenhof 2009
MelaFind	Multispectral device that uses automated software for image analysis	High sensitivity	Expensive and low specificity	96-98%	0-10%	Monheit et al 2009
Electrical impedance spectroscopy	Device that measures changes in tissue impedance to low voltage current flow	High sensitivity	Expensive, low specificity, requires presoaking of the lesion in saline, increases examination time	98%	25-49%	Mohr et al 2013, Aberg et al 2011
Smartphone apps	Cell phone programs that analyze self-taken photographs of suspicious lesions	Widely available, and some apps send photos to Board-certified dermatologists	Experimental and highly variable quality	7-98%	30-94%	Wolf et al 2013

2- Physiopathologie: progression du mélanome

Deux critères décrivent la progression du mélanome et permettent de déterminer son pronostic. L'indice de Breslow correspond à l'épaisseur de la tumeur, et est exprimé en millimètres. Alors que le modèle de Clark détermine le niveau d'invasion histologique de la tumeur durant la progression du mélanome.⁵²⁵ (Figure 4)

2.1- Modèle de Clark

2.1.1- Hyperplasie et formation d'un nævus bénin

Dans le modèle de Clark, le premier changement phénotypique est la prolifération des mélanocytes au niveau de la membrane basale aboutissant au développement d'un nævus bénin de couleur uniforme.¹²⁰

2.1.2- Cytologie atypique et formation d'un nævus dysplasique

La prochaine étape vers la formation du mélanome est l'acquisition de l'atypie cellulaire dans un nævus dysplasique résultant d'un nævus bénin préexistant ou d'une nouvelle lésion. Les lésions moléculaires à ce stade de progression peuvent affecter la croissance cellulaire, la réparation de l'ADN et la mort cellulaire.⁵²⁵

2.1.3- Phase de croissance radiale

Durant cette phase, les cellules acquièrent la capacité de proliférer latéralement dans l'épiderme et de former des niches de cellules tumorales dans le derme papillaire établissant ainsi un mélanome *in situ*. Ceci se traduit cliniquement par l'évolution d'une tache pigmentée vers une plaque palpable formant un cercle imparfait.^{173, 525} Cette étape est caractérisée par la surexpression de la cycline D1.

2.1.4- Phase de croissance verticale

Les lésions qui progressent vers cette phase acquièrent la capacité d'invasion dermique pour former un nodule expansible envahissant le derme papillaire. Les cellules peuvent également s'étendre dans le derme réticulaire et l'hypoderme, et sont capables de former des colonies sur l'agar et des nodules de tumeurs après leur injection chez les souris nude.⁵²⁵ Durant cette phase, les changements qui ont lieu touchent principalement le microenvironnement tumoral pour favoriser l'invasion cellulaire. Ces changements sont discutés en détails dans le chapitre suivant.

2.1.5- Mélanome métastatique

L'étape finale de la progression du mélanome est la dissémination des cellules tumorales vers de nouvelles régions de la peau ou d'autres organes. La dissémination est suivie de l'établissement d'une niche où a lieu la prolifération des cellules de mélanome. Ces cellules sont capables de former des colonies sur l'agar et de métastaser suite à leur implantation chez des souris nude.⁵²⁵

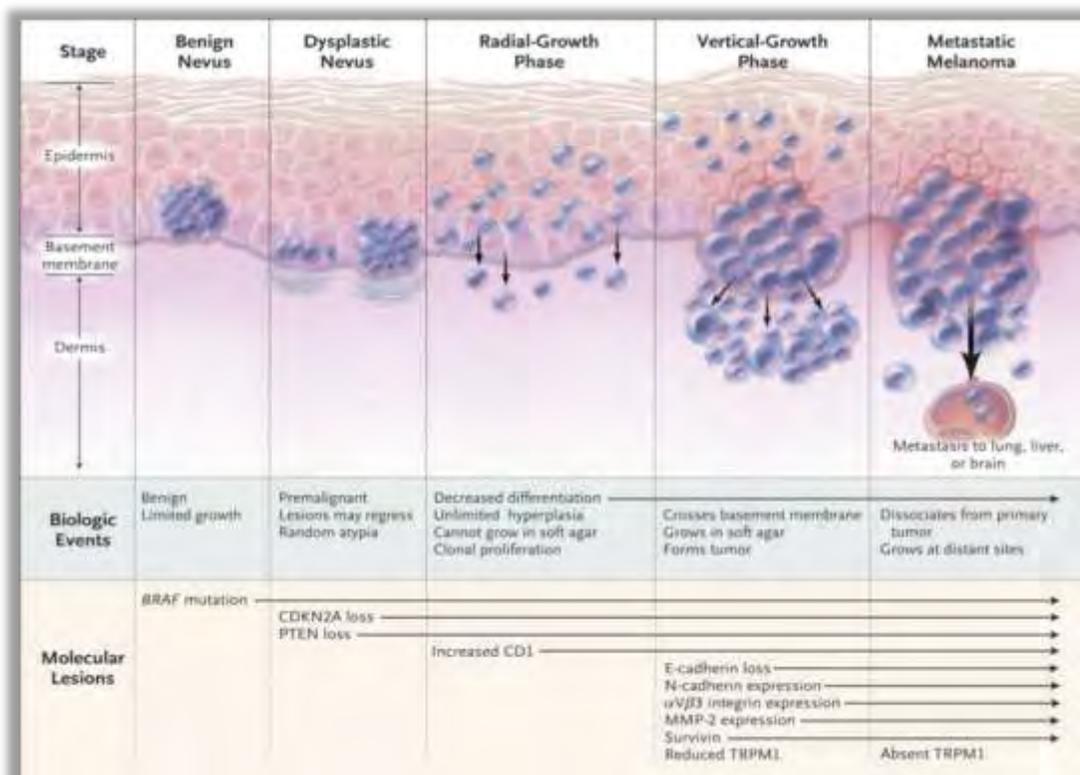


Figure 4: Évènements biologiques et changements moléculaires durant la progression du mélanome.⁵²⁵

2.2- Voies de signalisation du mélanome et altérations moléculaires

L'exposition intense au soleil des personnes génétiquement sensibles induit des dommages de l'ADN du type transitions G>T (induites par l'UVA) et C>T (induites par l'UVB), conduisant à une variété de mutations observées dans le mélanome (Tableau 2).^{306, 424} Ces mutations touchent des gènes régulateurs de la croissance, du cycle cellulaire, de l'adhésion intercellulaire, ainsi que des facteurs de transcription. Par conséquent, les mélanocytes peuvent proliférer et se propager dans l'épiderme et le derme, conduisant à la formation d'un nævus qui peut progresser en mélanome.^{257, 525}

Tableau 2: Voies de signalisation du mélanome et altérations moléculaires correspondantes.⁷⁷⁰

PATHWAY*	COMPONENTS MUTATED/ACTIVATED	TYPE OF ALTERATION
Receptor tyrosine kinases	KIT	Mutation/amplification
	EGFR	Activation
	MET	Activation; high level of ligand in stroma
	ERBB4	Mutation
	FGFR	Activation; high levels of ligands
Integrin adaptors/ECM signaling	NEDD9/HEF	Amplification
RAS/RAF/MEK/ERK	NRAS	Mutation
	BRAF	Mutation
	MEK1	Mutation
RAS/PI3K/PTEN/AKT/mTOR	PIK3CA	Mutation
	PTEN	Mutation
	AKT1, AKT2	Rare mutation
	AKT3	Amplification
NF1 (PI3K + MAPK pathways)	NF1	Mutation
RHO/RAC/other MAPKs	RAC	Mutation
	MAP3K5 & MAP3K9	Mutation
	PREX	Mutation
Glutamate receptors	GRIN2A	Mutation
	GRM3	Mutation
G proteins other than RAS, effectors of MAPK	GNAQ	Mutation
	GNA11	Mutation
Apoptosis	BCL2A1	Amplification
WNT/ β -catenin	CTNNB1	Mutation
CDK	CDK4	Mutation/amplification
	CCND1	Amplification
P53	P14ARF (CDKN2A)	Mutation/deletion
	MDM4	Amplification
RB1	P116INK4A (CDKN2A)	Mutation/deletion
MITF transcriptional program	MITF	Mutation/amplification
MYC transcriptional program	MYC	Amplification/overexpression
ETV1 transcriptional program	ETV1	Amplification
TERT	Promoter region of catalytic subunit	Mutation

* The order of pathways in this Table has no relationship to their significance in melanoma; it is simply from the cell periphery to the nucleus.

2.2.1- Voies de prolifération et de survie

2.2.1.1- RAS/RAF/MEK/ERK

Au niveau moléculaire, une activation anormale de la voie de signalisation MAPK/ERK stimule la croissance des cellules du mélanome.

Des facteurs de croissance (HGF, PDGF, FGF et SCF) se lient aux récepteurs tyrosine kinase (RTK) transmembranaires et induisent une cascade de signalisation qui régule des cibles nucléaires comme les facteurs de transcription MITF⁸⁹¹ et BRN-2²⁴⁶, les régulateurs du cycle cellulaire cycline D1⁴⁸, et p16INK4A²⁵⁸, et les enzymes MMP1³²⁵ et iNOS^{174 460}.

La cascade de signalisation de cette voie est composée de la petite GTPase RAS intramembranaire (HRAS, KRAS ou NRAS) et des kinases cytosoliques activées en aval RAF (ARAF, BRAF ou CRAF), MAP/ERK (MEK1 et MEK2) et MAPK (MAPK1 ou MAPK3; aussi connues comme ERK2 et ERK1).⁷⁴⁰

Les mutations somatiques des membres de cette voie touchent à priori N-RAS (associée à 18% des mélanomes⁴³²) et BRAF (associée à 60% des mélanomes⁷⁸⁵ dont 80% disposent de la substitution de la valine en acide glutamique V600E)¹³⁸. (Figure 5)

Ces mutations entraînent l'activation constitutive des sérine-thréonine kinases et la prolifération des mélanocytes pour former un nævus. Les signaux induits par ces protéines mutées sont contrôlés en aval pour éviter d'acquérir un caractère malin par les mélanocytes; en effet la mutation de BRAF chez des mélanocytes humains induit la sénescence cellulaire par l'activation de l'inhibiteur de la kinase cycline-dépendante 4 A (INK4A). Or, une mutation de ce dernier empêche l'arrêt du cycle cellulaire et ne protège plus d'une croissance hyperplasique.

Par conséquent, la mutation BRAF n'est pas le facteur limitant dans la progression du mélanome, d'autres lésions moléculaires s'avèrent indispensables pour ce fait. Ceci peut justifier les fréquences similaires de la mutation BRAF entre un nævus bénin et un mélanome métastatique.⁵²⁵

2.2.1.2- PTEN et AKT

Le locus PTEN du chromosome 10 est fréquemment affecté par une délétion homozygote dans le mélanome.²⁶⁷

PTEN code pour une phosphatase qui inhibe la signalisation intracellulaire induite par une variété de facteurs de croissance. En présence de ces derniers, les taux intracellulaires de phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3) augmentent rapidement. Cette augmentation entraîne l'activation de la protéine kinase B (PKB, également appelée AKT) par phosphorylation. AKT activée phosphoryle et inactive les protéines stimulatrices de l'apoptose et inhibitrices du cycle cellulaire, facilitant ainsi la prolifération et la survie des cellules.⁵²⁵ (Figure 5)

PTEN contrôle les taux de PIP3; en son absence, les taux de PIP3 et d'AKT phosphorylée (active) augmentent. L'augmentation de l'activité d'AKT prolonge la survie cellulaire par l'inactivation de la protéine BAD (BCL-2 antagonist of cell death), augmente la prolifération cellulaire en stimulant l'expression de la cycline D1, et affecte de nombreux autres gènes de survie et du cycle cellulaire par le biais de l'activation du facteur de transcription FKHR (forkhead transcription factor).⁹⁰³ L'expression d'AKT peut être augmentée non seulement en l'absence de PTEN mais également par des mutations qui causent l'amplification et la surexpression de cette protéine.

La restauration de PTEN dans les mélanocytes murins en culture diminue la capacité des cellules à former des tumeurs.⁸⁰¹ La suppression d'AKT3, un membre de la famille d'AKT, réduit la survie des cellules de mélanome et la progression des mélanomes humains implantés chez des souris nude immunodéficientes.⁸⁰²

2.2.2- Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire comprend une machinerie sensible à des signaux externes comprenant des signaux mitogènes, des signaux de différenciation et d'adhésion cellulaire. La dérégulation de ce cycle caractérise de nombreux cancers y compris le mélanome.²⁷⁸

2.2.2.1- CDKN2A

Dans certains cas familiaux et sporadiques de mélanome, le locus CDKN2A est perdu par délétion homozygote d'une partie du chromosome 9.³⁶⁰ L'épissage alternatif des exons du locus CDKN2A engendre deux suppresseurs de tumeur distincts, INK4A et ARF.⁷⁶⁰ (Figure 5)

2.2.2.1.1- INK4A:

INK4A ou p16^{INK4a} est une protéine qui inhibe la prolifération des cellules possédant un ADN endommagé ou des oncogènes activés, en bloquant le cycle cellulaire au point de contrôle G1-S par l'inhibition des kinases cycline-dépendantes (CDK).⁷⁶⁰ Les souris knock-out pour INK4A présentent un phénotype normal mais sont anormalement sensibles aux carcinogènes.⁷⁵⁴

Les gènes qui codent pour CDK4 et la cycline D1, situés en aval d'INK4A, sont également mutés chez certains patients. Ces cibles d'INK4A agissent sous forme d'un complexe qui favorise la progression du cycle cellulaire en phosphorylant la protéine du rétinoblastome (Rb) qui est un régulateur du cycle cellulaire.⁹⁴⁸

2.2.2.1.2- ARF:

ARF ou p14^{ARF} est une protéine qui promeut l'arrêt du cycle cellulaire ou la mort cellulaire après des dommages survenant à l'ADN ou après une prolifération cellulaire aberrante due aux différents oncogènes ou à la perte de Rb. Cette protéine participe aussi au contrôle des niveaux de la protéine p53 et ceci en séquestrant MDM2 (Mouse Double Minute 2) qui déclenche l'ubiquitination de p53 et sa destruction par le protéasome. ARF provoque ainsi l'accumulation de p53 et l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G2-M, ce qui permet la réparation de l'ADN endommagé ou l'induction de l'apoptose.⁶⁵²

In vitro, l'immortalisation des cellules se produit souvent avec la perte d'ARF ou de p53.³⁶¹ De plus, la déficience en ARF inhibe la sénescence induite par les oncogènes et augmente la susceptibilité des cellules à la transformation.⁷⁶¹ Chez la souris, la carence en ARF accélère le développement du mélanome après l'exposition aux UVs.⁶⁸⁶ Ces données suggèrent que ARF facilite la progression du mélanome et que la basse fréquence des mutations du gène p53 dans ce cancer est en partie liée à la perte de l'ARF, qui rend la voie p53 inactive.⁷⁶⁰

2.2.2.2- Cycline D1 (CD1)

Le gène de la cycline D1 (CCND1) est un gène de contrôle du cycle cellulaire amplifié dans 11-18% des cas de mélanome.^{228, 306} L'activité de la cycline D1 est régulée positivement par les voies de signalisation oncogéniques et négativement par les inhibiteurs de CDK, les CKI. En effet la voie RAF-MEK-ERK contrôle la transcription de la cycline D1 par la liaison des facteurs de transcription ETS et AP-1 au promoteur du gène CCND1 activant ainsi le cycle cellulaire.³⁸⁰ A l'inverse, les CKI (tels que p16^{Ink4a}) empêchent l'accès des complexes de CDK aux cyclines induisant ainsi l'arrêt de la croissance ou la sénescence cellulaire.^{484, 762}

Les signaux activateurs induisent l'expression des cyclines D qui se lient et activent la CDK4 et CDK6 pendant la phase G1. L'activation du complexe cycline D / CDK4-6 inhibe les répresseurs de transcription de la famille Rb par phosphorylation.⁴⁹⁰ L'inhibition de Rb favorise l'expression des cyclines E qui se lient et activent CDK2 par phosphorylation favorisant ainsi l'entrée en phase S du cycle cellulaire. Pendant la transition de la phase S à la phase G2, CDK2 est activée par les cyclines A. A la fin de la phase G2 les cyclines A activent CDK1 et lancent l'entrée en mitose, et la cycline B1 prend le relais le long de la mitose.^{306, 484} (Figure 5)

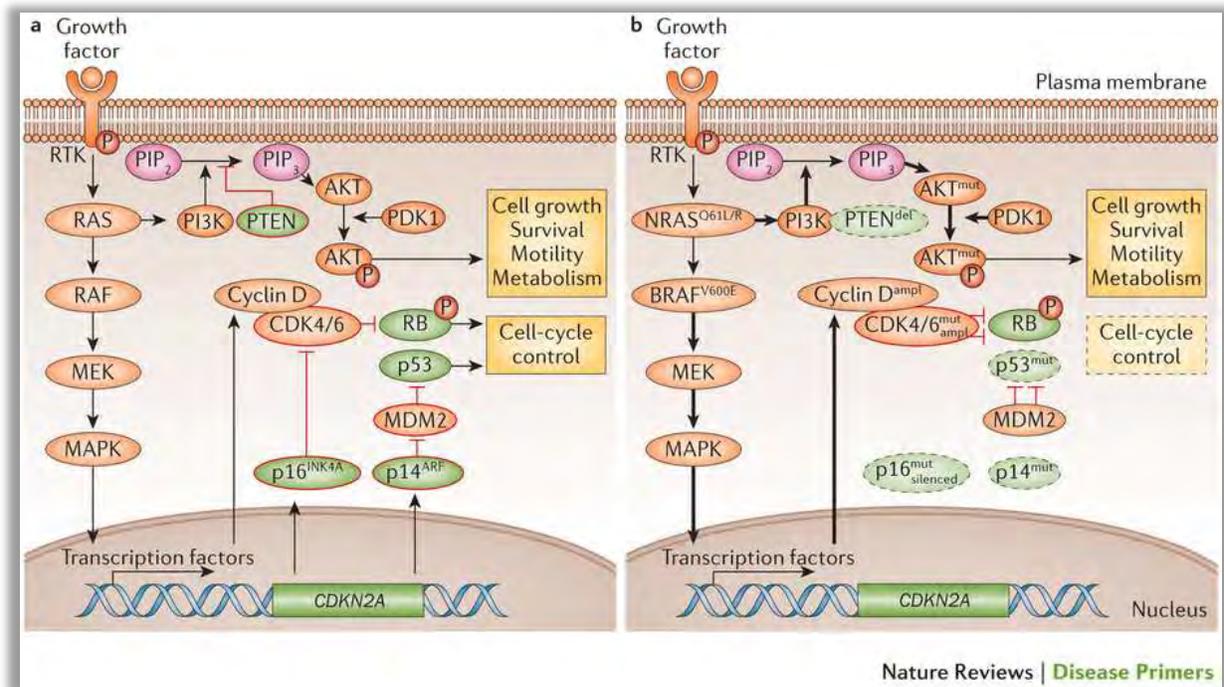


Figure 5: Voies de signalisation dans le cas normal (a) et dans le mélanome (b).⁷⁴⁰

2.2.3- Facteurs de transcription et régulateurs épigénétiques

2.2.3.1- Facteur de transcription associé à la microphthalmie (MITF)

MITF a été défini comme le régulateur principal du développement des mélanocytes et leur différenciation.⁴⁴¹ Les mutations touchant la fonction de MITF provoquent la perte de la lignée mélanocytaire. L'amplification de MITF a été identifiée dans environ 15% des mélanomes.²²⁶

Les cibles transcriptionnelles de MITF sont surtout des gènes spécifiques des mélanocytes et de la synthèse de mélanine tels que la tyrosinase, TRP-1, et Melan-A;^{159, 243} et des gènes de régulation du cycle cellulaire, dont CDK2.¹⁵⁸ En outre, l'expression du facteur induit par l'hypoxie (HIF1 α) est apparemment stimulée par MITF et engendre la survie des tumeurs, l'angiogenèse et les métastases. Paradoxalement, l'expression de MITF est réduite dans des conditions hypoxiques dans les mélanocytes normaux ainsi que dans le mélanome via la liaison directe du répresseur de transcription DEC1, qui est activé par HIF1 α , ce qui suggère une boucle de rétrocontrôle négatif.^{82, 188} De même BCL2A1, une protéine anti-apoptotique de la famille BCL2, surexprimée dans les mélanomes MITF^{high} semble être une cible de ce facteur de transcription. Cette protéine confère une résistance à l'inhibiteur de BRAF, sa suppression pourrait avoir un bénéfice clinique dans certains mélanomes.^{283, 770}

MITF est régulé par le facteur de transcription ATF2 dont l'activité confère un mauvais pronostic au mélanome.⁷⁵⁶ Certaines voies telles que α -MSH/MC1R, WNT et MAPK, ainsi que certaines modifications post-traductionnelles telles que l'addition du peptide SUMO, contrôlent l'expression MITF. (Figure 6) La variante MITF (E318K) présente chez les personnes touchées de mélanome familial abolit le site de SUMOylation de MITF qui inhibe l'activité transcriptionnelle de ce dernier.⁹²⁹ La structure cristalline de MITF a été déterminée récemment, ouvrant la voie à l'avenir au ciblage de ce facteur de transcription dans mélanome.⁶⁵⁰

D'autres régulateurs de la transcription comme Myc et la β -caténine nucléaire sont amplifiés dans le mélanome. Myc est un oncogène qui code pour un facteur de transcription alors que la β -caténine est un médiateur nucléaire de la voie Wnt.^{396, 699} Des mutations de perte de fonction dans ARID1A et ARID2, composantes du complexe SWI / SNF de remodelage de la chromatine, ont été également rapportées dans des cas de mélanome cutané.^{306, 465}

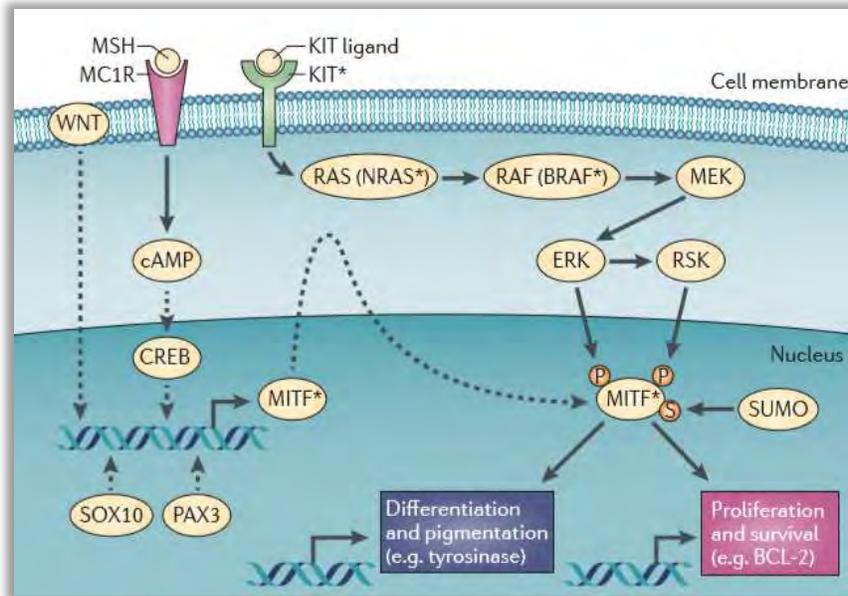


Figure 6: Différenciation mélanocytaire: l'axe MITF.¹⁹⁹

2.2.3.2- Régulateurs épigénétiques

L'hyperméthylation de gènes suppresseurs de tumeurs, y compris ceux qui sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la signalisation cellulaire, la transcription, la réparation de l'ADN et l'apoptose, a été constamment rapportée dans le mélanome. Straume et ses collaborateurs ont signalé une perte de l'expression de la protéine p16 par hyperméthylation du promoteur de CDKN2A dans 19% des mélanomes cutanés primaires et dans 33% des métastases. De même, l'inactivation épigénétique du gène O6-méthylguanine-DNA méthyltransférase (MGMT) par hyperméthylation de son promoteur a été rapportée dans 34% des échantillons de mélanome. Outre l'hyperméthylation, les profils d'expression génique ont révélé la perte d'expression de gènes suppresseurs de tumeur via la désacétylation réversible des résidus lysine des histones par les histones désacétylases (HDAC). Cette désacétylation touche CDKN1A ainsi que d'autres protéines proapoptotiques de la famille BCL-2 telles que Bim, Bax, et Bak.⁷³³

L'ensemble de ces données démontrent que les événements génétiques et épigénétiques contribuent à l'initiation et la progression du mélanome. Ces événements sont régulés en partie par des ARNs non codants entre autres les microARNs qui ont été associés à plusieurs caractéristiques du mélanome, telles que la prolifération (miR-137, miR-221), la résistance à la mort cellulaire (miR-18b et miR26a), l'invasion et les métastases (miR-214, let-7a).⁷³³

3- Thérapies ciblant les cellules du mélanome

Avant 2011, les patients atteints de mélanome avancé ou métastatique avaient un pronostic défavorable à long terme. Une meilleure compréhension de la biologie du mélanome a permis le développement de nouvelles thérapies ciblées.⁵²³

3.1- Chirurgie

Des modalités chirurgicales diverses sont utilisées pour le traitement du mélanome *in situ*:

- L'excision locale large: cette méthode consiste à l'ablation de la tumeur diagnostiquée cliniquement avec une marge de tissu normal qui l'entoure.²⁹⁷ La taille recommandée de la marge varie selon l'épaisseur de la tumeur et son emplacement. Pour éviter l'invasion du mélanome, l'excision avec au moins 0,5 cm de marges est recommandée.^{839, 851} L'académie Américaine de la dermatologie préconise des marges d'excision entre 0,5 et 1,0 cm, basées sur le diagnostic.⁴⁹ La différence dans les marges d'exérèse chirurgicale (<1 cm vs ≥ 1 cm) n'a aucune influence sur les taux de survie.⁵³⁶ A l'heure actuelle l'étude des marges appropriées pour le traitement du mélanome *in situ* reste un sujet de discussion entre des dermatologues.⁴⁹

- L'excision dépendante du stade: Le principe est identique à la première méthode, mais dans ce cas les tissus prélevés sont testés pour contrôler les marges. Si ces dernières présentent toujours des cellules tumorales, la fermeture définitive du lit de la plaie est retardée, et du tissu supplémentaire est chirurgicalement enlevé.²⁹⁷

- La chirurgie micrographique de Mohs: cette méthode utilise des coupes congelées pour examiner toutes les parties de l'épiderme. Cette technique peut être combinée avec des marquages d'immunohistochimie visualisant les mélanocytes (tels que HMB-45, MEL-5, MITF²⁴⁰, et MART-1^{292, 377}) pour mieux délimiter les marges chirurgicales.⁶⁹ Le taux de récurrence d'un mélanome *in situ* après la chirurgie de Mohs est inférieur à 10%.²⁹⁷

Contrairement au mélanome *in situ*, la chirurgie n'est habituellement pas une option curative chez les patients atteints de mélanome métastatique. Néanmoins, en cas de propagation limitée aux tissus mous ou à un seul organe viscéral, la résection complète de la métastase est réalisable basée sur les caractéristiques de la tumeur précédemment identifiées.⁷⁴⁰

3.2- Chimiothérapie

Historiquement, le traitement systémique de patients atteints de mélanome avancé était centré sur la chimiothérapie avec la dacarbazine ou d'autres agents alkylants, tels que le témozolomide, la fotémustine ou les taxanes.¹⁶⁶

La dacarbazine induit des taux de réponse jusqu'à 25% sans aucun avantage sur la survie globale.⁷⁵⁵ Sa combinaison à des cytokines (interleukine-2 ou interférons) dans le cadre de biochimiothérapie, ou à d'autres agents chimiothérapeutiques (cisplatine, vinblastine, vincristine, tamoxifène) dans le cadre de polychimiothérapies a amélioré le taux de réponses sans amélioration de la survie par rapport à la monochimiothérapie.^{108, 167} Les effets indésirables courants liés au traitement avec la dacarbazine sont des nausées et des vomissements gérables par des antiémétiques chez la plupart des patients.⁷⁵⁵

Dans un essai de phase III, le traitement par le témozolomide, alternative orale à la dacarbazine, n'a pas amélioré la survie globale médiane chez les patients atteints de mélanome métastatique nouvellement diagnostiqué, par rapport à la dacarbazine.⁵²⁴ Toutefois, le témozolomide peut traverser la barrière hémato-encéphalique et est largement utilisé chez les patients présentant des métastases cérébrales.⁶

La fotémustine a également montré une amélioration des taux de réponse par rapport à la dacarbazine, ainsi qu'une tendance à l'amélioration de la survie globale chez les patients atteints de métastases cérébrales dans un essai clinique de phase III.⁶⁷³ Bien qu'elle soit utilisée dans certains pays de l'UE, la fotémustine n'est pas encore approuvée par l'agence Européenne des médicaments (EMA).

Un essai plus récent de phase III a montré que les nanoparticules Paclitaxel liées à l'albumine (nab-P) ont amélioré de manière significative la survie médiane sans progression (PFS) par rapport à la dacarbazine, avec une tendance à l'amélioration de la survie globale médiane.²⁹⁶

La tendance actuelle dans le traitement du mélanome métastatique consiste à combiner la chimiothérapie à d'autres types de traitements plus ciblés, ainsi la chimiothérapie n'est plus un traitement classique de première ligne mais une thérapie palliative lors de la progression du mélanome.⁵²³

3.3- Thérapie ciblée

Comme déjà énoncé, plusieurs mutations génétiques clés contribuent à l'incidence et la progression du mélanome. La voie MAPK/ERK peut être activée par plusieurs mécanismes liés au cancer y compris des mutations dans RAS, BRAF et MEK1, la perte du suppresseur de tumeur NF1, la liaison d'un ligand aux RTK, ou l'activation mutationnelle de ce récepteur. Ces altérations moléculaires conduisent à une prolifération cellulaire excessive par l'activation de ERK1/2.^{468, 656} Par conséquent, le ciblage de la cascade MAPK/ERK est d'intérêt dans le mélanome. Des inhibiteurs de BRAF et de MEK ont donc été développés.⁸⁸

3.3.1- Inhibiteurs de BRAF

Avant l'approbation des inhibiteurs de BRAF, les patients atteints de mélanome et portant la forme mutée de BRAF présentaient un mauvais pronostic par rapport aux patients portant la forme sauvage de cette kinase.⁴⁶⁸

Il est cependant crucial d'examiner les tumeurs pour ce type de mutation avant d'amorcer le traitement pour identifier les patients sensibles aux inhibiteurs de BRAF muté.¹⁰⁷ En effet l'utilisation de ces inhibiteurs chez des patients de mélanome portant la forme sauvage de cette kinase représente une contre-indication en raison de la possibilité de l'activation de la voie MAPK/ERK.⁹³

3.3.1.1- Sorafénib

Sorafénib (BAY 43-9006) est un inhibiteur non-sélectif de kinases multiples développé contre RAF1 mais qui cible encore BRAF-V600E d'une façon dix fois moins puissante.^{286, 895} Les investigations mécanistiques suggèrent que Sorafénib se lie à la conformation inactive des kinases RAF, mais n'inhibe pas efficacement l'activation d'ERK.^{198, 894}

Sorafénib n'a pas montré une efficacité significative en monothérapie dans le mélanome probablement en raison de l'antagonisme du récepteur VEGFR.^{170, 683} Ainsi, des inhibiteurs plus puissants et sélectifs de la kinase RAF ont été développés pour des applications cliniques dans le mélanome.¹⁹⁹

3.3.1.2- Vémurafénib (Zelboraf®)

Vémurafénib (PLX4032) est un inhibiteur puissant de BRAF approuvé par la FDA pour le traitement des patients atteints de mélanome métastatique portant la mutation BRAFV600E.^{107, 523}

PLX4032 a été développé avec la structure cristalline de BRAF-V600E en tant que matrice afin de générer un inhibiteur de la conformation active de cette kinase.^{378, 915} Les tests sur la kinase RAF ont montré que PLX4032 et ses analogues étaient capables d'inhiber BRAF V600E, la forme sauvage de BRAF ainsi que RAF1 à des concentrations similaires.⁸⁵⁰

Les essais cliniques de phase I ont révélé que le traitement par vémurafénib a induit la stabilisation de la maladie, ainsi que la régression marquée du mélanome chez certains cas portant la forme mutée BRAF V600E.¹⁹⁷

Le taux de réponse objective en phase II a augmenté de 19% à 53% par rapport à la dacarbazine, et la durée moyenne de la réponse a été prolongée de 2,7 à 6,7 mois.⁷⁹⁵

L'essai clinique de phase III réalisé en 2011 a rapporté un taux de réponse de 48% lorsque les patients ont été traités avec le vémurafénib, par rapport à un taux de 5% avec le traitement par la dacarbazine, avec une survie médiane sans progression estimée à 5,3 mois chez le groupe traité par le vémurafénib par rapport à 1,6 mois chez le groupe traité par la dacarbazine.^{107, 311}

Des données actualisées sur le traitement par vémurafénib ont été publiées en mars 2014. Dans cette étude 83 patients de mélanome BRAF muté traités par la dacarbazine (25 %) ont bénéficié d'un traitement avec le vémurafénib. La médiane de survie était significativement améliorée dans le bras vémurafénib, 13,6 mois versus 9,7 mois pour la dacarbazine.⁵¹¹

Les effets secondaires du vémurafénib les plus fréquemment rapportés sont la photosensibilité, le développement de carcinomes cutanés épidermoïdes, de kératoacanthomes, les arthralgies, le rash cutané, et parfois l'apparition de nouveaux mélanomes.⁵¹¹

3.3.1.3- Dabrafénib (Tafinlar®)

Un second inhibiteur de BRAF, dabrafénib (ou GSK2118436), a également gagné l'approbation de la FDA en 2013, pour le traitement des mélanomes exprimant les variantes BRAF V600E ou BRAF-V600K.²⁷

En 2012, l'étude de phase I réalisée sur 156 patients atteints de mélanome métastatique muté BRAF a signalé une réponse de 69% suite à l'administration de la dose maximale tolérée. Il est intéressant de noter que neuf sur dix patients porteurs de métastases cérébrales, avaient montré une réponse tumorale intracrânienne.¹⁸⁷

L'étude de phase II publiée en 2013 a été réalisée sur 76 patients porteurs d'une mutation BRAF V600E et 16 patients mutés V600K. 59 % des patients mutés BRAF V600E avaient une réponse partielle ou complète et 16 % d'entre eux avaient une maladie stable. Pour les patients mutés V600K, 13 % avaient une réponse partielle ou complète et 44 % ont rapporté une stabilité de la maladie. Il est intéressant de noter que dans le groupe V600E, la survie sans progression était de 6,3 mois alors qu'elle était de 4,5 mois dans le groupe V600K.²⁷

Dans l'essai de phase III, des patients atteints de mélanomes stades III ou IV non opérables étaient randomisés pour recevoir un traitement par dabrafénib (187 patients) ou par la dacarbazine (63 patients). La survie médiane sans progression était de 5,1 mois dans le bras dabrafénib et de 2,7 mois dans le bras dacarbazine.²⁸⁵

Les effets secondaires les plus courants pour le dabrafénib (déduts de cinq études cliniques) étaient l'hyperkératose, les maux de tête, l'arthralgie et la fièvre.⁸²⁴

Comme pour le vémurafénib, plusieurs patients traités par le dabrafénib ont également développé un kératoacanthome, un carcinome épidermoïde de la peau. La croissance de ces lésions au début et au cours du traitement semble être la conséquence d'un effet stimulateur des inhibiteurs sélectifs de BRAF sur l'activité de la voie ERK dans les cellules WT pour BRAF.^{291, 654, 815}

Le LGX818, un autre inhibiteur puissant de BRAF est actuellement en développement. Cet inhibiteur a montré des résultats prometteurs dans les premiers essais cliniques; une étude de phase III est en cours.^{168, 814}

L'émergence des inhibiteurs de BRAF dans l'arsenal thérapeutique du traitement du mélanome de stade avancé constitue une véritable révolution thérapeutique vu la rapidité impressionnante de la réponse à ce traitement. Cependant, la durabilité de cette réponse est limitée dans le temps en raison de la résistance, la rechute et la progression ultérieure de la maladie.^{763, 876} Les essais cliniques en phase III ont montré qu'environ 50% des patients traités avec le vémurafénib ou le dabrafénib rechutent dans les 6-7 mois après le début du traitement.^{287, 511} Les mécanismes complexes de résistance peuvent être divisés en trois groupes :

- Réactivation de la voie RAS-RAF-MEK-ERK par l'émergence de clones portant des mutations activatrices de NRAS ou MEK
- Activation de la voie de survie cellulaire PI3K/Akt par délétion du gène suppresseur de tumeur PTEN, et inhibition de l'apoptose médiée par Bim
- Modulation du microenvironnement tumoral

Certaines résistances peuvent être retardées par le «crossover» ou la combinaison de thérapies ciblées, d'autres requièrent le ciblage du microenvironnement tumoral.⁷¹⁴

3.3.2- Inhibiteurs de MEK

BRAF activé phosphoryle et active les kinases MEK 1 et 2 qui à leur tour activent ERK, aboutissant ainsi à la prolifération et la survie des cellules tumorales. Tramétinib est un inhibiteur administré oralement hautement sélectif des kinases MEK 1 et 2.³⁷⁵ Ce médicament a reçu l'approbation de la FDA et l'EMA pour le traitement du mélanome avancé muté BRAFV600.

Un essai de phase I publié en 2012 sur 36 patients de mélanome métastatique muté BRAF a montré que sur 30 patients naïfs au traitement, le taux de réponse objective était de 33 % avec une survie sans progression de 5,7 mois. Quatre de six patients ayant déjà reçu un inhibiteur de BRAF ont présenté une maladie stable sous traitement.¹⁸⁶

Un essai de phase II publié en 2013 a comparé le tramétinib en monothérapie chez des sujets BRAF mutés naïfs (57 patients) ou précédemment traités par un inhibiteur de BRAF (40 patients). Parmi les patients naïfs, 24 % présentaient une réponse objective et 51 % une maladie stable avec une médiane de survie sans récurrence de 4 mois. Parmi les prétraités, aucune réponse

objective n'a été obtenue et 28 % des patients avaient une maladie stable avec une médiane de survie sans récurrence de 1,8 mois.³⁷⁵

Dans un essai de phase III, comparant le tramétinib à la chimiothérapie, 322 patients mutés V600E ou V600K étaient randomisés (ratio 2:1). La survie sans progression et le taux de réponse objective étaient respectivement de 4,8 mois et de 22% dans le groupe tramétinib versus 1,5 mois et 8% dans le groupe chimiothérapie.²⁰⁰

Les effets secondaires principaux du tramétinib sont une éruption acnéiforme, la fatigue, la diarrhée et des œdèmes périphériques.³⁷⁵

3.3.3- Inhibiteurs de cKIT

cKIT est le récepteur du SCF (*stem cell factor*), leur liaison contrôle plusieurs voies de signalisation intracellulaires impliquées dans le développement des mélanocytes, dont les voies MAPK/ERK et PI3K/Akt. L'imatinib est l'inhibiteur de KIT utilisé chez des patients de mélanome porteurs d'une mutation ou d'une amplification de KIT. Le nilotinib et le dasatinib sont deux autres inhibiteurs de KIT utilisés dans la leucémie myéloïde chronique et qui sont encore en étude dans le mélanome.⁷¹⁴

Les différents essais de phase II sur l'imatinib chez des patients de mélanome présentant une aberration de cKIT (mutation ou amplification) ont montré un taux de réponse global de l'ordre de 20 % avec une survie globale médiane de l'ordre d'un an.^{96, 268, 305}

Cependant, comme pour les autres thérapies ciblées, les patients développent une résistance dont les mécanismes sont encore peu connus. Certains résultats suggèrent une activation de la voie PI3K,⁷⁷⁴ d'autres la survenue d'autres mutations au niveau du récepteur KIT.⁸⁴³ Mais ce qui reste toujours évident c'est le rôle du microenvironnement d'où l'importance de la compréhension des mécanismes qui régulent non seulement la cellule tumorale mais aussi la niche qui l'entoure. Des stratégies associant des inhibiteurs ciblant la cellule tumorale et son microenvironnement pourraient apporter un large intérêt aux patients qui présentent un risque important de rechute.

II. Microenvironnement du mélanome

Bien que le cancer ait longtemps été considéré comme une maladie étroitement liée aux mutations génétiques de la cellule tumorale²⁷⁷, le rôle de son microenvironnement a été de plus en plus démontré au cours de ces dernières années²⁷⁶. En effet, le microenvironnement tumoral peut fournir des signaux promoteurs ou à l'inverse suppresseurs de tumeur contrôlant l'initiation et la progression tumorales; ainsi que la réponse aux thérapies.³⁸¹

Le microenvironnement tumoral est composé de cellules stromales et de la matrice extracellulaire qu'elles produisent. Les cellules stromales comprennent les cellules endothéliales, les péricytes, les fibroblastes et les cellules immunitaires. Ces cellules sont génétiquement stables (contrairement aux cellules tumorales) mais sensibles aux régulations épigénétiques.³¹⁹

La compréhension des mécanismes moléculaires qui régulent les interactions entre les cellules cancéreuses malignes et les cellules bénignes du stroma tumoral représente un défi majeur dans la recherche sur le cancer ainsi que la mise en place de thérapies innovantes.³⁷³

1- Composantes du stroma tumoral et rôle dans l'invasion et la dissémination du mélanome

1.1- La matrice extracellulaire

L'une des premières étapes dans la formation d'un microenvironnement tumoral est le remodelage de la matrice extracellulaire.³⁷³

La matrice extracellulaire (ECM) est constituée de fibres protéiques (ex: collagène, élastine), des glycosaminoglycanes (ex: acide hyaluronique), des protéoglycanes (ex: héparane sulfate), et d'autres glycoconjugués structuraux (ex: fibronectine, laminine). Beaucoup de ces composants sont synthétisés par les fibroblastes qui dans le cancer se transforment en myofibroblastes et sécrètent des protéines, les métallo-protéases (MMP) qui induisent la dégradation et le remodelage de l'ECM permettant ainsi l'invasion des cellules cancéreuses et les métastases.⁶³

1.1.1- Les intégrines

Les interactions entre les cellules tumorales et les macromolécules de la matrice extracellulaire sont médiées par les intégrines qui sont des hétérodimères formés par l'association non covalente de deux sous-unités transmembranaires α et β .³¹⁴ Leurs domaines extracellulaires se lient aux différentes macromolécules de l'ECM, alors que leurs domaines intracellulaires sont reliés directement ou indirectement au cytosquelette d'actine.²⁵ De ce fait les intégrines servent de récepteurs de signalisation bidirectionnelle régulant d'une part l'expression génique et l'activité protéique, et d'autre part l'adhésion à la surface cellulaire.²³⁵ Elles contrôlent alors divers effets biologiques tels que la prolifération, la survie et l'invasion cellulaire.⁶⁴

Plusieurs preuves expérimentales documentent l'importance des intégrines $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha \nu\beta 3$ dans la progression du mélanome.¹⁹¹ En effet, les intégrines $\beta 1$ ont été impliquées dans la migration et l'invasion cellulaire du mélanome.⁵¹⁴ De même, l'intégrine $\alpha \nu\beta 3$ a été associée à un potentiel invasif des cellules de mélanome et à leur progression de la phase de croissance radiale à la phase de croissance verticale de la tumorigenèse.^{317, 751} L'intégrine $\alpha \nu\beta 3$ joue également un rôle crucial dans l'angiogenèse tumorale, ainsi que dans la migration trans-endothéliale des cellules de mélanome participant ainsi au processus métastatique.^{780, 875}

1.1.2- Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance servent d'un moyen de communication indirect entre les cellules de mélanome et les cellules voisines. Ces facteurs peuvent agir d'une manière autocrine pour stimuler la prolifération et l'invasion des cellules de mélanome, ou d'une manière paracrine en agissant sur la prolifération des fibroblastes et l'angiogenèse.⁴²⁶

Certains facteurs de croissance sont exprimés de manière constitutive par le mélanome de stade avancé, et jouent un rôle important dans la croissance et l'invasion tumorales.⁴³ Parmi ces facteurs, le PDGF s'avère important pour l'organisation du stroma, en particulier la production de la matrice extracellulaire.²⁰¹ Il est également capable d'induire l'angiogenèse par la stimulation du VEGF.¹⁸⁰ Le VEGF pourrait agir en stimulant la croissance des cellules endothéliales mais aussi la migration, l'invasion et la formation des tubes vasculaires.⁷⁸²

1.1.3- Le collagène

Le collagène est un hétérotrimère composé de trois chaînes codées par des gènes distincts. Chaque chaîne comporte des domaines collagéniques interrompus à plusieurs reprises par des séquences non collagéniques (NC), ainsi qu'un court domaine N-terminal et un domaine C-terminal non collagénique appelé NC1.^{62, 321} Des études immunohistochimiques ont mis en évidence la présence de plusieurs types de collagène dans la membrane basale.⁶¹⁸

Le collagène de type IV est le collagène le plus abondant dans la membrane basale. Il participe à la diffusion et la migration des cellules de mélanome.¹¹⁰

Le collagène de type XVIII est localisé dans la membrane basale de l'épithélium vasculaire.²⁷⁴ Le clivage par des protéases (MMP7, cathepsine L, élastase pancréatique¹⁹⁴) de son domaine NC1 génère un fragment de 28 kDa, l'endostatine qui a des propriétés anti-angiogéniques et antitumorales puissantes en particulier dans le cadre du mélanome.^{376, 499, 579, 687}

Le collagène de type XV est structurellement homologue au collagène de type XVIII.⁴⁴⁵ Il présente une forte expression dans le cœur, les muscles squelettiques et le placenta, comme il est localisé également dans la membrane basale des capillaires.¹⁷¹ Le collagène de type XV contient dans son domaine NC1 une séquence restine, montrant une homologie structurale avec l'endostatine et présentant également une activité anti-angiogénique.^{310, 678}

Un autre type de collagène, le type XIX, a été décrit dans la membrane basale des cellules épithéliales vasculaires, neuronales, et mésenchymateuses. Hormis son rôle dans les interactions de la membrane basale avec le stroma, aucun rôle précis n'a été attribué à ce type de collagène. Néanmoins, son implication dans les processus angiogéniques a été suggérée.⁵⁵⁶

1.1.4- L'élastine

L'élastine est la principale composante des fibres élastiques, elle est synthétisée par les fibroblastes sous forme du précurseur tropoélastine. L'élastine est résistante à la plupart des enzymes protéolytiques sauf l'élastase et certaines MMP. L'interaction entre les peptides dérivés

de la dégradation de l'élastine (EDP) et les différents types cellulaires peut déclencher diverses réactions biologiques notamment dans les cellules cancéreuses.⁴⁰⁷

Certaines études suggèrent que les fragments protéolytiques de l'élastine favorisent l'invasion des cellules du mélanome par la liaison au récepteur S-gal de l'élastine.⁵⁷³ Ceci est en accord avec les observations cliniques qui rapportent une association entre la dégradation de l'élastine dans le mélanome et les taux de mortalité élevés.¹⁸⁹ De même, l'expression du récepteur S-gal serait plus importante au niveau du site de l'invasion de mélanome, et associée à une forte expression des métalloprotéases matricielles MMP.⁴⁰⁷

1.1.5- Les Protéoglycanes

Les protéoglycanes sont également des composantes de la membrane basale, ils lui confèrent des propriétés telles que l'augmentation de l'hydratation, la perméabilité sélective et la capacité de lier et stocker les facteurs de croissance. Ils gardent également l'intégrité de la membrane basale, et la protègent contre la dégradation protéolytique.⁸⁴¹

Les protéoglycanes sont constitués d'une protéine liée à des dérivés sulfatés de sucre, les glycosaminoglycanes, en particulier, au niveau des résidus Sérine / Thréonine.⁶¹⁸

Le protéoglycane majeur des membranes basales est le perlécane. Il peut être synthétisé par plusieurs types cellulaires y compris les cellules épithéliales, fibroblastiques, et endothéliales, et les cellules de mélanome ou de carcinome.³³⁷

La principale propriété du perlécane est de lier les autres composants des membranes basales telles que le collagène IV, et les laminines, et de promouvoir ainsi la progression tumorale.^{310, 841}

Le perlécane renforce la croissance et l'invasion des cellules tumorales *in vitro* par sa capacité à capturer et stocker les facteurs angiogéniques tels que FGF-2.³³⁷ Une expression accrue du perlécane a été rapportée dans le mélanome métastatique¹²⁵, sa suppression par des ADNc antisens freine la prolifération, l'invasion des cellules du mélanome ainsi que l'angiogenèse et la croissance tumorale *in vivo*.^{3, 759}

1.1.6- Les laminines

Les laminines sont une grande famille de glycoprotéines hétérotrimériques principalement localisées dans la membrane basale. Elles sont composées de trois chaînes polypeptidiques génétiquement distinctes α , β et γ associées par des ponts disulfures pour former une hélice. La diversité de ces chaînes génère des isoformes différents qui sont spécifiques aux tissus.¹²⁷

Au cours de leur invasion, les cellules du mélanome perforent la membrane basale par la dégradation protéolytique de la laminine en peptides. Ces derniers peuvent à leur tour promouvoir l'invasion des cellules tumorales par l'induction de métallo-protéases matricielles MMP.⁴⁰⁶

1.1.7- L'ostéopontine

L'ostéopontine (OPN) est une phosphoglycoprotéine riche en acide sialique, qui facilite les interactions entre les cellules tumorales et l'ECM et favorise la progression du cancer.⁴⁰³

Après sa liaison aux intégrines cellulaires, l'OPN active les voies de survie entre autres la voie PI3K et ceci en s'opposant à l'activité de PTEN qui est un inhibiteur de la voie PI3K, contribuant ainsi à la progression du mélanome.⁶⁰⁵ La surexpression de l'OPN a été décrite dans le mélanome métastatique en comparaison avec des nævi bénins. Son inhibition par des siRNA ou son invalidation dans des modèles OPN^{-/-} de souris réduit la prolifération et l'invasion cellulaire et limite la croissance tumorale.^{60, 403}

1.1.8- L'ostéonectine

L'ostéonectine ou SPARC (protéine acide sécrétée riche en cystéine) est une glycoprotéine impliquée dans les interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement.^{67, 117}

En ce qui concerne le mélanome, il semble que l'expression de SPARC est fortement corrélée avec l'état clinique des individus. En effet, une expression modérée de cette protéine a été observée dans les nævi néoplasiques, elle s'accroît dans les mélanomes primaires et métastatiques.⁴³⁰ La surexpression de SPARC a été associée à une augmentation de la densité vasculaire, du recrutement des cellules stromales, de l'invasion médiée par la cathépsine B et de

la croissance cellulaire.^{239, 655} Son inhibition stimule l'expression de la E-cadhérine, l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G2 / M, et l'inhibition de la croissance tumorale par l'activation des suppresseurs de tumeur p53 et p21.^{192, 786}

1.1.9- La ténascine C

La ténascine C (TNC) est une glycoprotéine de l'ECM impliquée dans la régulation de la migration cellulaire, la prolifération, l'invasion et l'angiogenèse. Les premières études réalisées sur des cellules de mélanome ont démontré le rôle essentiel de cette protéine dans l'adhérence cellulaire médiée par l'intégrine et dans la réorganisation de l'ECM métastatique.²¹³

D'autre part, les études réalisées en immunohistochimie sur des coupes de mélanome primaire ont établi le rôle fondamental de la ténascine C dans le pronostic de ce cancer.³³³ En effet, l'expression de la TNC a été positivement corrélée avec l'épaisseur de la tumeur et les métastases dans les ganglions lymphatiques sentinelles.³⁵⁹ En outre, la TNC a été également identifiée dans le sérum de patients atteints de mélanome de stade avancé ce qui permet de l'utiliser comme un marqueur circulant dans le diagnostic du mélanome.⁶³⁸

Quant à la régulation de la ténascine C, il a été démontré que le TGF- β 1 produit par les cellules de mélanome est capable d'induire l'expression de la TNC qui à son tour contribue à la rénovation du stroma et à la croissance / survie des cellules tumorales.⁴⁴

1.1.10- CCN3

CCN3 est une protéine de la matrice extracellulaire qui régule principalement la prolifération des fibroblastes dans le microenvironnement tumoral.²¹²

Des études en immunohistochimie réalisées sur des lésions de mélanome ont démontré que la régulation de CCN3 est strictement corrélée à l'épaisseur de la tumeur.⁸⁵⁷ D'autres études réalisées sur des lignées cellulaires de mélanome métastatique ont montré que la surexpression de CCN3 induit l'expression de la laminine et des récepteurs aux intégrines α 7 β 1 et α v β 5, modifiant l'adhérence et contribuant ainsi à la progression du mélanome.²¹⁵

Ces données sont en contraste avec des études qui ont montré une activité anti-tumorale de CCN3. En effet, lorsque l'expression de CCN3 dans les mélanocytes est inhibée, une série d'événements a lieu évoquant une transformation néoplasique.²¹² Or la ré-expression de CCN3 dans ces cellules apporte une réduction de leur capacité invasive.²¹⁴

1.1.11- Les métalloprotéinases matricielles (MMP)

Les métalloprotéinases participent au dialogue entre les cellules du mélanome et les cellules stromales pour contrôler l'invasion de la matrice extracellulaire. Par exemple, la sécrétion de la MMP-13 par les fibroblastes active la MMP-1 produite par les cellules du mélanome, ce qui facilite la pénétration de ces dernières dans les matrices de collagène *in vitro*.⁴¹

Les MMP interviennent sur différents niveaux de la progression tumorale, en effet certaines MMP telles que MMP-9 sont associées à l'initiation de la dégradation matricielle et ne sont exprimées que pendant les phases précoces de la progression du mélanome.⁸⁶¹ D'autres MMP telles que MMP-2 et MT1-MMP interviennent au niveau de l'angiogenèse, phénomène qui nécessite la protéolyse de la matrice extra-cellulaire et la migration des cellules endothéliales.⁸⁰⁹

En outre, certaines MMP telles que MMP-2 agissent sur le plan de l'invasion et des métastases.^{309, 574} En effet, la surexpression de MMP-2 a été corrélée avec le potentiel métastatique dans des modèles de xéno greffe des cellules de mélanome *in vivo*, et sa déficience dans des modèles murins a réduit la formation de métastases expérimentales.³⁴⁰ En ce qui concerne les tumeurs mélanocytaires humaines, une corrélation négative a été rapportée entre l'expression de MMP-2 et les taux de survie.³⁰⁹ Alors qu'une corrélation positive entre la progression tumorale et les métalloprotéases MMP-1 et -3, MT1-MMP, MT2-MMP et MT3-MMP a été signalée.^{7, 569, 587}

L'activité des MMP est contrôlée par leurs inhibiteurs TIMP qui réduisent la capacité métastatique des cellules de mélanome. Par exemple, la protéine recombinante TIMP-2 inhibe la protéolyse médiée par les cellules tumorales, la croissance tumorale et les métastases pulmonaires.¹⁴² D'autres facteurs tels que certaines cytokines (IL-8, IL-1 β , TNF- α) et molécules d'adhérence (CD44, intégrines α β 3 et α 2 β 1) sont également impliqués dans la régulation de l'expression, l'activité et la localisation des MMP.⁷¹⁸

1.2- La composante cellulaire

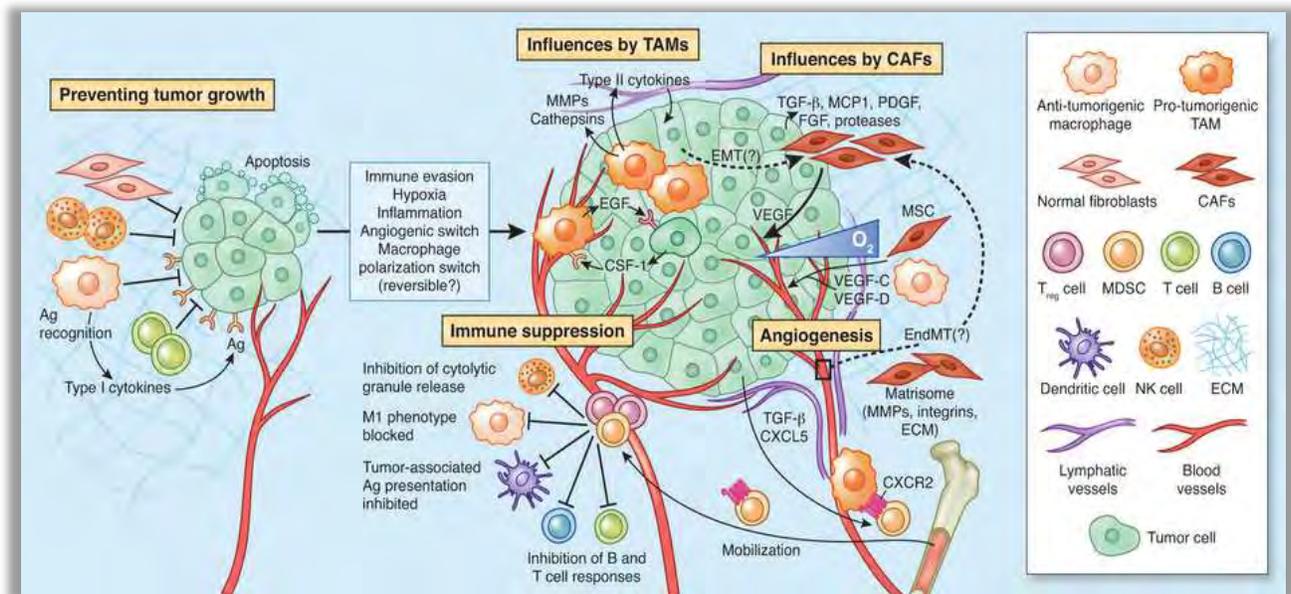


Figure 7: Une variété de cellules stromales soutient la formation d'une niche tumorale primaire.⁶⁷¹

1.2.1- Les kératinocytes

Dans une peau saine, les kératinocytes résident conjointement avec les mélanocytes avec un ratio bien déterminé: un mélanocyte pour 35 kératinocytes. Cette homéostasie est conservée grâce aux interactions cellulaires médiées par les molécules d'adhésion telles que l'E-cadhérine.⁸³¹

Les cadhérines sont constituées de trois domaines: le domaine extracellulaire qui facilite la liaison homotypique avec les cadhérines des cellules voisines, le domaine transmembranaire qui sert à l'ancrage de la protéine à la membrane, et le domaine intracellulaire qui interagit avec les caténines pour initier la signalisation cellulaire. Ainsi les cadhérines permettent la liaison au cytosquelette d'actine, l'entretien des contacts avec les cellules adjacentes et le maintien de l'homéostasie observée dans le microenvironnement épidermique non-transformé.⁴³³

Pendant la mélanomagenèse, les mélanocytes présentent une perte de l'expression de l'E-cadhérine concomitante avec une expression accrue de la N-cadhérine et de l'intégrine $\alpha\beta 3$.⁹ Ces changements d'expression ont été observés dans des cultures en deux dimensions de

mélanocytes seuls. Cependant des essais de co-culture avec des kératinocytes inversent ces profils d'expression, et soulignent l'importance de ces cellules dans le contrôle du mélanome.⁸⁵⁸

Ce « switch » de la E- à la N-cadhérine permet aux cellules de mélanome de créer des interactions homotypiques avec des cellules exprimant la N-cadhérine telles que les fibroblastes et les cellules endothéliales. La N-cadhérine accorde des propriétés de survie aux cellules de mélanome et ceci par la répression de facteurs pro-apoptotiques comme Bad, et par l'activation de la voie PI3K.^{318, 446} A l'inverse, la E-cadhérine empêche la progression tumorale en inhibant la voie β -caténine qui favorise la prolifération en induisant la transcription des gènes régulateurs de la croissance et de la survie tels que c-Myc, cycline D1, et MITF.^{252, 422, 893}

La perte de l'expression de la E-cadhérine dans les mélanocytes a été associée à une régulation positive de ses répresseurs Snail^{38, 87} et Slug⁵⁴. Sa réintroduction dans des cellules de mélanome les rend moins mobiles, probablement par un mécanisme réglé par les kératinocytes.³¹⁶

1.2.2- Les fibroblastes

La croissance tumorale ne peut être maintenue, sauf en présence des fibroblastes qui sont la source principale des composants de la matrice extracellulaire. (Figure 7)

La participation des fibroblastes à la croissance et la progression du mélanome se produit en plusieurs étapes⁷¹⁸:

- 1- Recrutement des fibroblastes résidents, ou de leurs précurseurs mésenchymateux circulants.
- 2- Activation et prolifération des fibroblastes recrutés. Les fibroblastes, suite à leur activation, produisent des facteurs de croissance, tels que l'IGF1, SF, bFGF et TGF- β .
- 3- Différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, ou en fibrocytes qui sécrètent la composante fibrillaire de matrice extracellulaire et contribuent à la formation du stroma desmoplastique qui caractérise de nombreux cancers avancés.

Les myofibroblastes sont identifiables, en outre, par l'expression de l' α -SMA (α -Smooth Muscle Actin). Ils sont rares dans les tissus sains, mais prolifèrent en présence de plaies ou d'inflammation chronique pour favoriser la réparation tissulaire. Les myofibroblastes participent à la progression tumorale en favorisant la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, l'invasion et les

métastases. L'activité protumorale des myofibroblastes a été mise en évidence par la transplantation de fibroblastes associés au cancer avec des cellules cancéreuses chez la souris, et encore par la perturbation génétique et pharmacologique de leurs fonctions chez des souris portant des tumeurs.^{643, 681}

1.2.3- La vascularisation et l'angiogenèse

L'angiogenèse est un facteur extrinsèque nécessaire à la nutrition et la croissance des cellules tumorales. (Figure 7) Elle implique les cellules endothéliales et les péricytes qui les soutiennent. L'inhibition de l'angiogenèse réduit la biodisponibilité des facteurs de croissance mitogéniques provenant du sang et limite la progression tumorale.

1.2.3.1- Les cellules endothéliales :

Les mécanismes du développement, de la différenciation et de l'homéostasie des cellules endothéliales composant les artères, les veines et les capillaires ont commencé à être bien déterminés dans les années 2000.

Au cours de la dernière décennie, un réseau de voies de signalisation interconnectées (par exemple Notch, Neuropilin, Robo, et Eph-A / B) a été ajouté aux signalisations VEGF, angiopoïétine, et FGF déjà connues. Ces voies nouvellement caractérisées ont été fonctionnellement impliquées dans l'angiogenèse et le développement tumoral.⁹²

Les études des profils de l'expression génique des marqueurs exprimés à la surface des cellules endothéliales de la lumière vasculaire, ont révélé une différence entre les cellules endothéliales normales et celles associées à la tumeur. La connaissance des différences dans la signalisation et le profil transcriptomique de ces cellules peut conduire au développement de nouvelles thérapies qui ciblent sélectivement les cellules endothéliales associées à la tumeur.^{558, 719}

1.2.3.2- Les péricytes :

Les péricytes sont des cellules mésenchymateuses spécialisées possédant des projections qui entourent les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Dans les tissus normaux, les

péricytes fournissent des signaux paracrines de soutien à l'endothélium normalement au repos. Ainsi, l'angiopoïétine-1 sécrétée par les péricytes transmet des signaux antiprolifératifs de stabilisation qui sont reçus par le récepteur Tie2 exprimé à la surface des cellules endothéliales; certains péricytes produisent également des niveaux faibles de VEGF qui possède une fonction trophique assurant l'homéostasie endothéliale. Les péricytes collaborent également avec les cellules endothéliales pour synthétiser la membrane basale vasculaire qui ancre ces deux types cellulaires et aide les parois vasculaires à résister à la pression hydrostatique de la circulation sanguine.^{42, 218}

La perturbation génétique et pharmacologique du recrutement et de l'association des péricytes a démontré l'importance fonctionnelle de ces cellules dans le support de l'endothélium tumoral. En effet, l'inhibition pharmacologique de la signalisation via le récepteur de PDGF exprimé par les péricytes tumoraux réduit la couverture des vaisseaux tumoraux par ces cellules, ce qui déstabilise l'intégrité et la fonction vasculaire et limite la progression tumorale.^{218, 643} Autrement, une hypothèse intrigante suppose que la vascularisation ayant une couverture péricytaire faible pourrait permettre une pénétration des cellules cancéreuses dans le système circulatoire, facilitant la dissémination tumorale.^{231, 684}

1.2.4- Les cellules inflammatoires et immunocompétentes

Comme déjà énoncé le mélanome n'est pas simplement une maladie cellulaire dans laquelle une série de mutations oncogéniques mène à la prolifération. Sa progression dépend du microenvironnement tumoral et en particulier de la réponse immunitaire de l'hôte. Le mélanome est un cancer immunogène capable d'évoquer des réponses immunitaires humorales et cellulaires. La phase de croissance radiale du mélanome primaire est régulièrement associée à une réaction lymphocytaire dermique importante, induisant parfois la destruction partielle de la tumeur.⁴⁰⁵ L'expansion clonale des lymphocytes T prélevés à partir de ces lésions montre qu'ils sont cytotoxiques *in vitro* pour les cellules de mélanome autologues.¹⁹³ La réaction lymphocytaire est moins marquée durant la phase de croissance verticale du mélanome primaire, toutefois elle est corrélée à une survie prolongée et une incidence réduite du cancer métastatique.^{123, 619}

Cette réponse immunitaire basée sur la reconnaissance et la destruction des cellules cancéreuses a été nommée l'immunosurveillance, processus énoncé par Paul Ehrlich au début du XX^e siècle. Malheureusement, les cellules cancéreuses échappent à l'immunosurveillance en développant des variantes non-immunogènes de cellules tumorales (immunosélection) ou par la suppression immunitaire (immunosubversion).⁹⁴⁴ (Figure 8)

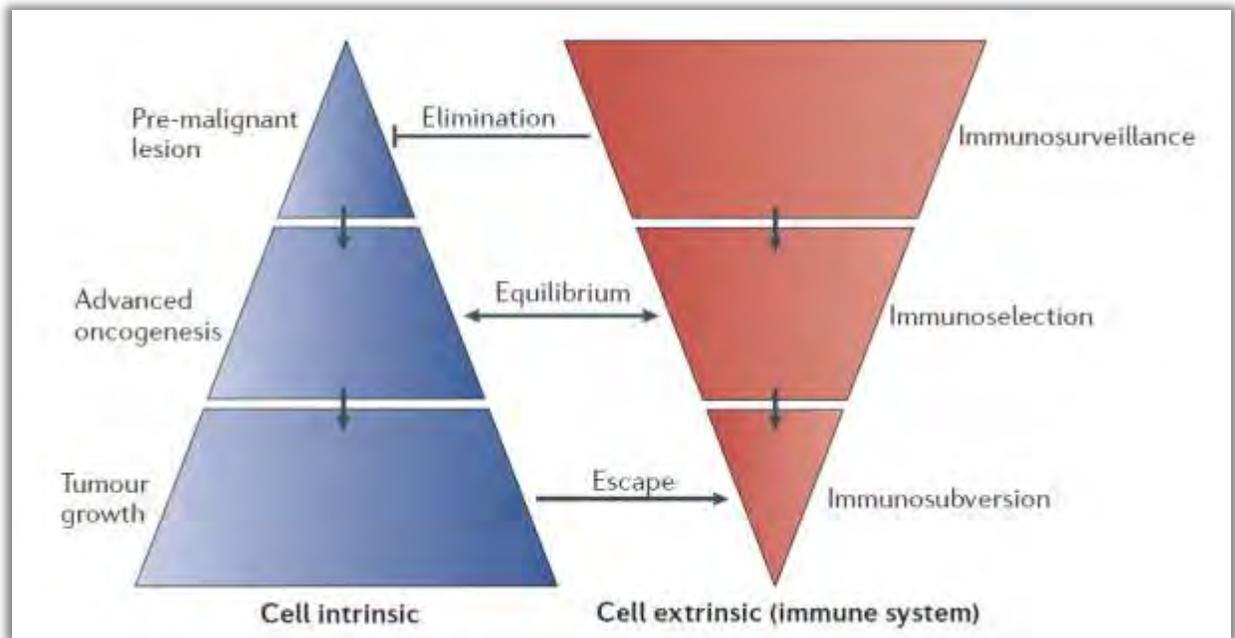


Figure 8: Relation entre les aspects cellulaires intrinsèques et extrinsèques de la progression tumorale.⁹⁴⁴ La carcinogénèse résulte du crosstalk entre les facteurs intrinsèques à la cellule cancéreuse et les facteurs extrinsèques dépendant du système immunitaire de l'hôte.

L'échappement immunitaire dans le mélanome est médié à la fois par les cellules tumorales et les cellules stromales de l'hôte.⁷⁰¹ Les cellules tumorales sont caractérisées par la perte des molécules de CMH-I⁷⁵², la régulation à la baisse des antigènes associés aux tumeurs, et la sécrétion intensive de facteurs immunosuppresseurs tels que le VEGF, le TGF- β , l'interleukine (IL-10), et l'oxyde nitrique (NO). Les cellules stromales participent à l'échappement immunitaire par le recrutement, l'expansion et l'activation de cellules immunosuppressives diverses y compris les cellules T régulatrices (Treg),²¹⁹ les macrophages associés à la tumeur (TAM),⁷⁷⁸ les cellules dendritiques immatures (DC)⁷⁷³ et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC).^{216, 854}

1.2.4.1- Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC)

Les MDSC ont été décrites comme une population hétérogène de cellules myéloïdes immunosuppressives immatures qui sont des précurseurs de cellules dendritiques, macrophages, et granulocytes.^{217, 601} Chez la souris, les MDSCs expriment les deux marqueurs CD11b et Gr1, elles comprennent deux sous-populations principales: granulocytaire Ly6G⁺ Ly6C^{low} et monocytaire Ly6G⁻ Ly6C^{high}. Leurs homologues humains sont caractérisés par le phénotype HLA-DR^{-/low} CD11b⁺ et comprennent trois sous-populations: les MDSC neutrophiles (n-MDSC) CD14⁻ CD15⁺, les MDSC monocytes (m-MDSC) CD14⁺ CD15⁻, et les MDSC immatures (i-MDSC) CD15⁻ CD14⁻.^{216, 601, 636}

Les MDSC sont recrutées par les tumeurs en progression, et ont été détectées chez les patients de mélanome de stade III / IV. Ces cellules sont capables de promouvoir l'angiogenèse dans le mélanome par la production de plusieurs facteurs pro-angiogéniques tels que MMP-8/9, IL-8, PDGF et VEGF. Elles peuvent également favoriser l'invasion tumorale et les métastases par un processus qui implique de nombreuses métalloprotéases.⁵⁹

En outre, les MDSC réduisent le potentiel immunitaire antitumoral en interférant avec l'activité des lymphocytes T et des cellules NK par:^{216, 601, 610}

- La production de l'oxyde nitrique (NO) et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui provoquent la nitration des récepteurs (TCR) et l'apoptose des cellules T
- La privation de la L-arginine (via l'arginase) et de la cystéine qui sont essentielles aux fonctions des cellules T
- L'expression du TGF-β membranaire qui induit l'anergie des cellules T et NK
- La stimulation des lymphocytes T régulateurs (Treg)

La génération, l'expansion et la migration des MDSC sont sous le contrôle de différents facteurs de croissance (ex: GM-CSF, G-CSF, M-CSF, SCF, VEGF), cytokines (ex: IL-4, IL-6, IL-13), et chimiokines (ex: CCL2, CCL4). La signalisation intracellulaire implique principalement les facteurs de transcription STAT3, STAT6 et NF-κB qui empêchent la différenciation des MDSC et activent leur prolifération.^{129, 216, 931}

1.2.4.2- Les cellules dendritiques (DC)

Les cellules dendritiques sont les cellules présentatrices d'antigènes les plus professionnelles. Elles proviennent des précurseurs CD34⁺ résidents dans la moelle osseuse, et se distribuent dans les ports cutanés et muqueux où elles scannent et capturent les antigènes périphériques et les absorbent par phagocytose, et macropinocytose ou endocytose. Suite à l'activation antigénique (rencontre d'un microbe, d'un ligand des TLR ou d'une cellule transformée), ces cellules migrent dans les organes lymphoïdes secondaires et subissent un processus de maturation au cours duquel elles s'engagent dans l'immunité antigène spécifique. Elles induisent ainsi la prolifération et la différenciation des cellules T.⁷⁹⁶ Les DC peuvent également moduler les acteurs de l'immunité innée qui sont les cellules NK et NKT.^{109, 467, 943}

La maturation des DC est associée à (i) la décharge des complexes peptide-CMHII à la surface cellulaire à partir de vésicules non-lysosomales, (ii) l'expression des molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86, (iii) la sécrétion des cytokines Th1, y compris l'interleukine IL-12p70, (iv) la sécrétion de chimiokines qui attirent les différents effecteurs immunitaires (Th1, Th2, Tc, NK) vers les ganglions lymphatiques.^{806, 807}

Toutefois en absence de stimulation appropriée, les DC immatures induisent la tolérance immunitaire via la suppression des thymocytes autoréactifs, l'induction de l'anergie des cellules T mûres ou la génération des cellules T régulatrices.⁸⁰⁸ (Figure 9)

Plusieurs facteurs de croissance (IL-10, TGF- β , G-CSF, HGF) modulent la maturation des DC et induisent leur différenciation. Les mécanismes favorisant l'engagement des cellules T par les DC matures incluent l'interaction du CD40 avec son ligand CD40L ainsi que l'activation d'autres molécules de costimulation telles que CD80 et CD86.⁴¹⁸ A l'inverse, les récepteurs CTLA-4 et PD-1 atténuent l'intensité d'activation des cellules T.^{132,720}

Plusieurs études ont rapporté le rôle des DC dans le cancer et ont signalé le blocage de la différenciation des DC du stade immature au stade mature.⁸⁶⁵

Dans le mélanome, l'importance des DC dans l'induction d'une immunité antitumorale a été montrée sur des modèles animaux.³⁷⁹ En effet, les DC infiltrant le mélanome ont la capacité de traiter les antigènes et de migrer vers les ganglions lymphatiques pour activer les lymphocytes T

et induire une immunité anti-tumorale spontanée protégeant ainsi les souris contre l'agressivité tumorale.^{658, 659} L'évaluation des DC à différents stades cliniques du mélanome semble refléter une diminution progressive de leur fonction concomitante à la progression de la maladie. Ceci se produit spécifiquement au stade IV et concerne principalement les DC myéloïdes dont le nombre est inversement corrélé à celui de la population Treg. Les DC sont fortement modifiées dans le mélanome avancé, notamment avec une expression diminuée des molécules de costimulation CD80 et CD86, qui contrôlent la présentation antigènes aux cellules T.¹⁸⁵

Cependant, des données récentes montrent que l'infiltration du mélanome primitif par les DC et les cellules neutrophiles est aussi associée à un mauvais pronostic.³⁴⁵ L'association entre la présence des DC dans la tumeur mélanique et le pronostic reste donc encore à clarifier.

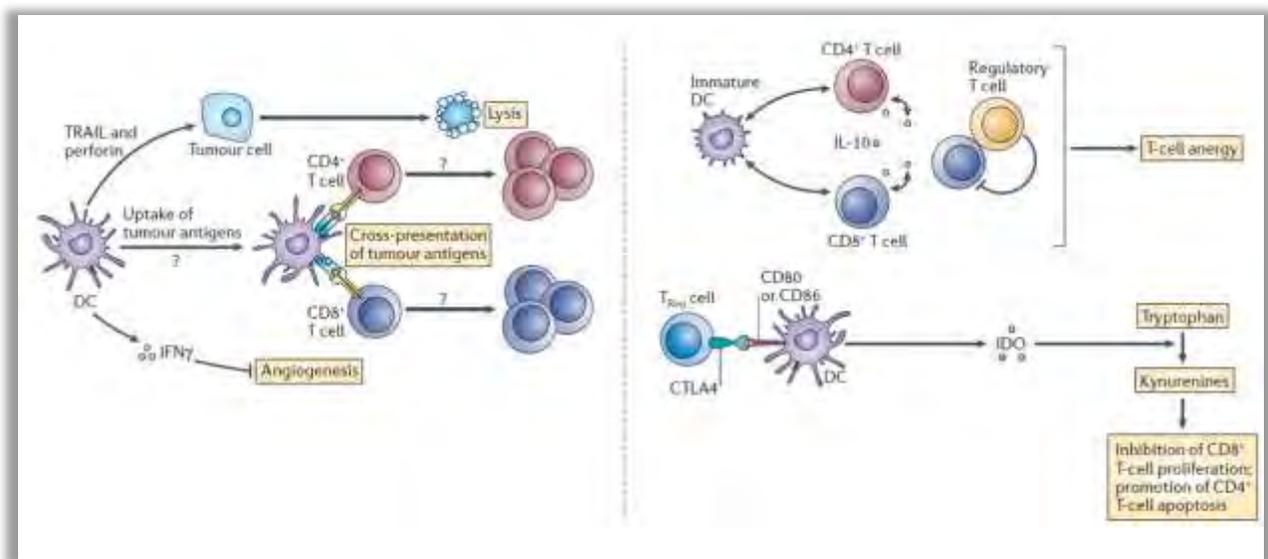


Figure 9: Mécanismes d'immunosurveillance (gauche) et d'échappement immunitaire (droite) des DC dans le cancer.⁹⁴⁴ Gauche: Les cellules dendritiques tuent les cellules tumorales d'une manière dépendante de TRAIL et de la perforine. Elles présentent aussi les antigènes tumoraux aux cellules T et produisent de l'IFN- γ qui inhibe l'angiogenèse. Droite: en haut : La stimulation répétée des cellules T naïves par les DCs immatures conduit à l'anergie des cellules T, induite par la production de l'IL-10, ou l'activation des cellules Treg, qui inhibent l'action des cellules T CD8⁺. En bas: L'interaction entre les molécules de costimulation CD80 ou CD86 présentes à la surface de DCs, et le CTLA-4 exprimé par les cellules Treg, induit la production du facteur immunosuppresseur indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) par les DCs. Il en résulte la réduction de la quantité du tryptophane qui nourrit les cellules T, et la génération de kynurénines qui tuent les cellules T.

1.2.4.3- Les neutrophiles

Les neutrophiles sont des granulocytes de courte durée de vie et sont dérivés à partir des précurseurs myéloïdes de la moelle osseuse. Vu leur activité cytotoxique, de nombreuses études ont abordé le rôle de ces cellules dans le cancer, et la possibilité d'utiliser leur fonction dans le cadre de thérapies anti-cancéreuses.¹⁴⁶

Toutefois, certaines études ont associé l'infiltration des tumeurs par les neutrophiles à de mauvais résultats cliniques dans plusieurs types de cancer, y compris le mélanome.³⁴⁷ Des études supplémentaires ont rapporté les mécanismes responsables de l'effet protumoral des neutrophiles associés aux tumeurs (TAN), ainsi les neutrophiles pourraient:¹⁶⁵

- **Renforcer la prolifération des cellules tumorales:** les neutrophiles augmentent la prolifération des cellules de carcinome pulmonaire *in vitro*. A l'inverse, l'inhibition de leur recrutement par des antagonistes de CXCR2 ralentit la croissance tumorale *in vivo*.⁸³⁵
- **Améliorer l'angiogenèse** par la libération de MMP9 et de VEGF.¹⁶⁵
- **Promouvoir la motilité, la migration, l'invasion tumorales et les métastases**^{812, 905} par la dégradation de la matrice extracellulaire *via* la libération de plusieurs enzymes, telles que l'élastase, la cathepsine G, la protéinase-3, les métalloprotéases matricielles MMP8 et MMP9, ou par la libération de cytokines et de facteurs de croissance qui stimulent l'invasion tumorale et la progression métastatique.^{335, 757} Ainsi il a été démontré dans un modèle murin de fibrosarcome que l'appauvrissement systémique en neutrophiles ou le blocage de leur infiltration dans la tumeur primaire entraîne une diminution significative du potentiel métastatique.^{797, 834}
- **Contribuer à la suppression immunitaire** d'une manière similaire à celle décrite pour les MDSC.¹⁶⁴ Ainsi, des études récentes montrent que la déplétion des neutrophiles est associée à une activation plus prononcée de cellules T CD8⁺ et à une réduction de la croissance tumorale. Pour exercer leurs activités immunosuppressives, les neutrophiles pourraient dégranuler l'arginase 1 qui est un inhibiteur bien connu des fonctions de cellules T.^{208, 712}
- **Produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS)** par la NADPH oxydase et la myéloperoxydase qui pourraient induire des modifications géniques et promouvoir la carcinogenèse.³⁸³

Dans le mélanome, plusieurs études ont associé l'infiltration des neutrophiles à la progression tumorale et à un mauvais pronostic.^{153, 345} L'infiltration la plus importante a été décrite dans les tumeurs épaisses et invasives, ainsi que dans les zones ulcérées. Ces TAN stimuleraient l'angiogenèse et l'invasion de la membrane basale via des protéases qui aident au remodelage de l'ECM.⁸³⁶

1.2.4.4- Les cellules natural killer (NK)

Les cellules NK sont des cellules lymphoïdes granuleuses CD3⁻ CD56⁺ historiquement définies par leur capacité à lyser, sans activation préalable, une variété de cellules tumorales, qui n'expriment pas les molécules de CMH-I.^{294, 849}

L'étude de la biologie des cellules NK et de leur fonction a conduit à deux dogmes:

- 1- Les cellules NK sont stimulées par "le manque de reconnaissance du soi" c'est-à-dire l'absence du CMH à la surface de la cellule ciblée.³⁶⁶
- 2- Les cellules NK participent à surveillance immunitaire en particulier contre le cancer.

Plusieurs travaux ont montré que ces cellules expriment des récepteurs activateurs portant des séquences ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) ou inhibiteurs portant des séquences ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif). Lorsqu'une cellule NK rencontre une cellule cible, la lyse de cette dernière ne se produira que si les signaux d'activation surpassent les signaux d'inhibition. Les principaux signaux inhibiteurs proviennent des récepteurs qui reconnaissent les molécules de CMH-I, tels que les KIR ou NKJG2A.^{417, 541} L'activation d'un seul type de récepteur KIR suffit à empêcher l'activation du NK alors qu'il faut toujours plusieurs signaux activateurs différents pour provoquer la dégranulation du NK et la mort de la cellule cible. Les signaux d'activation sont variés, et comportent notamment des protéines produites par des cellules stressées comme les cellules tumorales et les cellules infectées par des virus. Ces protéines se fixent sur des récepteurs exprimés sur les cellules NK tels que NKp46, NKp30 et NK p44. Ce système d'équilibre dynamique activation / inhibition permet en pratique aux cellules NK de lyser toutes les cellules dépourvues des molécules du

CMH de classe I dont les cellules tumorales qui échappent à la reconnaissance par les lymphocytes T en diminuant l'expression du CMH-I à leur surface.^{417, 541} (Figure 10)

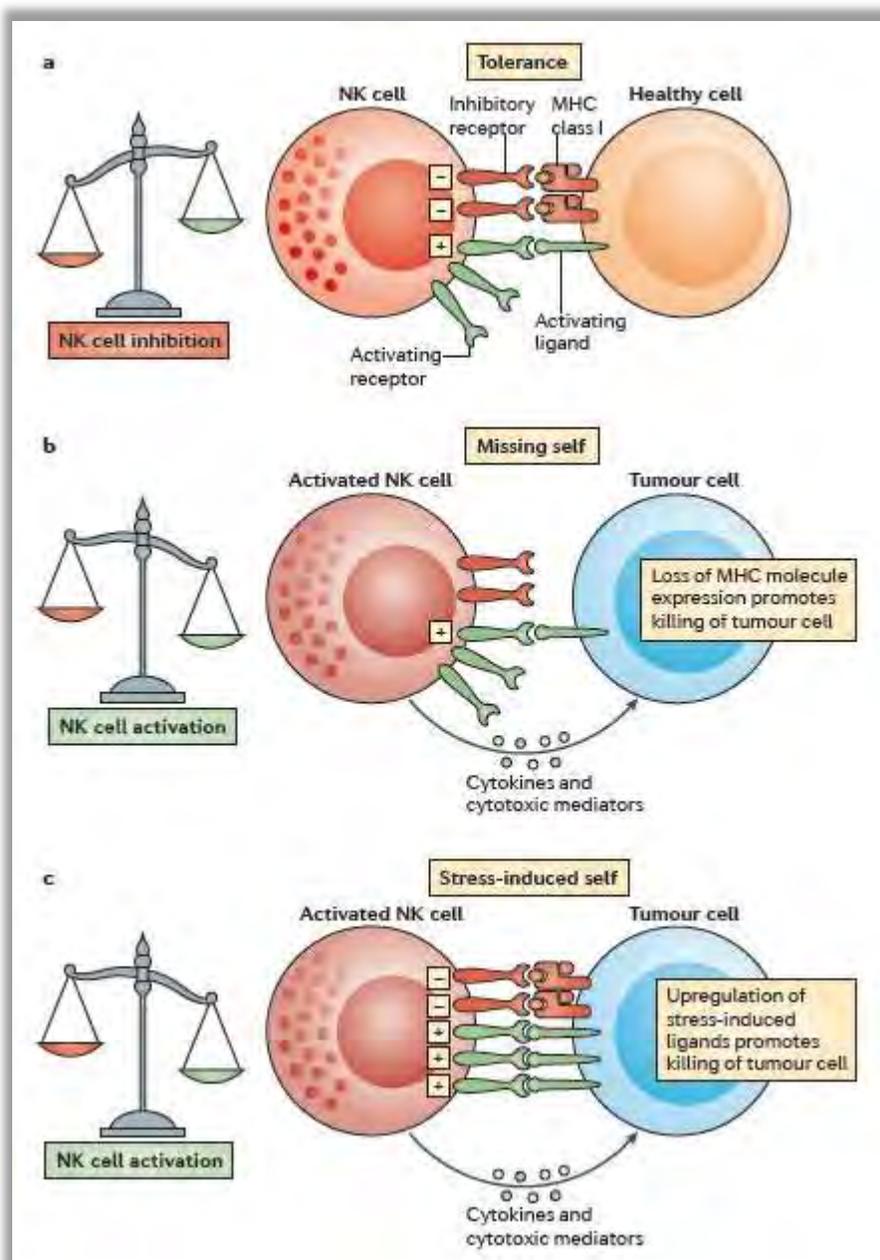


Figure 10: La reconnaissance des cellules tumorales par les cellules NK.⁸⁷³ a- Les cellules NK sont tolérantes aux cellules saines de l'hôte, les signaux d'activation qu'ils reçoivent sont amortis par l'engagement de récepteurs inhibiteurs ce qui se traduit par la tolérance; b- Les cellules tumorales peuvent perdre l'expression des molécules du CMH-I, ce qui lève le signal inhibiteur du CMH sur les cellules NK et permet leur activation. c- Les cellules stressées augmentent l'expression des ligands activateurs des cellules NK et permettent ainsi de surmonter la signalisation inhibitrice délivrée par les molécules du CMH-I. L'activation des cellules NK mène soit à une élimination directe des cellules tumorales par l'intermédiaire de la cytotoxicité des cellules NK, soit à une élimination indirecte par l'intermédiaire de la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'interféron- γ .

Après leur activation, les cellules NK peuvent directement tuer les cellules cibles par la libération de perforines et de granzymes,^{452, 874} ou exercer un effet immunomodulateur sur la production de cytokines telles que IFN- γ , TNF- α , MIP-1 α , GMCSF et RANTES (CCL5).¹⁵⁴ Les cellules NK seraient la source principale d'IFN- γ *in vivo*; une cytokine cruciale pour le priming des cellules Th1.⁵⁰¹ La sous-population CD56^{dim} CD16⁺ prédominante dans le sang et les sites d'inflammation, est connue pour son potentiel cytotoxique. Tandis que la sous-population CD56^{bright} CD16⁻ prédominante dans les ganglions lymphatiques possède une faible cytotoxicité mais une bonne capacité à produire des cytokines.⁸⁷⁷

Les cellules NK peuvent également favoriser la maturation des cellules dendritiques et accroître leur capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires et stimuler les réponses des cellules T. Elles peuvent tuer les cellules dendritiques qui n'ont pas effectué une maturation complète.^{537, 886}

Les cellules de mélanome expriment à leur surface des ligands activateurs des cellules NK, et régulent négativement l'expression des molécules de CMH-I pour échapper à la surveillance des lymphocytes T CD8⁺.^{227, 518} Ces deux mécanismes permettent la reconnaissance et la lyse des cellules de mélanome par les cellules NK.^{81, 94, 634}

Les cellules NK activées par l'IL-2, contrairement aux cellules NK au repos, exercent une activité cytotoxique efficace contre les lignées cellulaires de mélanome autologues ou allogéniques.^{94, 788} Ceci est vraisemblablement dû au fait qu'elles peuvent exprimer des niveaux plus élevés de récepteurs d'activation.⁷⁵ Les récepteurs impliqués le plus souvent dans la reconnaissance et la lyse des cellules de mélanome sont: NKG2D, NCR et DNAM-1.

1.2.4.4.1- NKG2D et mélanome

Le récepteur NKG2D humain est un récepteur de type lectine C exprimé de manière constitutive sur les cellules NK, T et NKT.^{78, 105, 635} Ce récepteur activateur des cellules NK, promeut à la fois la lyse des cellules cibles et la libération de cytokines. Il agit aussi comme un récepteur de costimulation des cellules T CD8⁺.^{78, 877}

Les ligands de NKG2D comprennent les protéines MICA et MICB apparentées au CMH-I, et les protéines de liaison à l'UL-16 (ULBP1-5). Ils peuvent être régulés à la hausse dans des conditions de stress telles que la transformation tumorale ou infectieuse.^{78, 877} L'analyse de

l'expression de ces ligands sur les lignées cellulaires de mélanome ont montré que MICA/B sont exprimés dans la majorité des lignées cellulaires (~80%) tandis les ULBPs sont moins fréquents (~15-25%).⁹⁷ 77,5% des tumeurs primaires et 65% des mélanomes métastatiques expriment MICA / B.⁸⁶⁹ Une autre étude a montré que seules les tumeurs primaires expriment un niveau significatif des ligands de NKG2D, suggérant qu'une diminution de l'expression de ces ligands dans les cellules tumorales peut se produire en fonction de l'évolution de la maladie⁴⁷¹.

Les cellules de mélanome pourraient échapper à la reconnaissance immunitaire médiée par NKG2D en utilisant différentes stratégies.⁷⁸⁸ Par exemple, l'expression de MICA sur les cellules de mélanome peut être régulée négativement par l'IL-10 ce qui réduit la sensibilité de ces cellules à la lyse médiée par les cellules NK.⁷⁵³ Ainsi, la libération de MICA et ULBP-2, dans le sérum de patients atteints de mélanome a été associée à une survie globale réduite.⁶¹⁷

1.2.4.4.2- Récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR) et mélanome

Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des immunoglobulines et comprennent 3 membres identifiés: NKp30 et NKp46 qui sont exprimés de manière constitutive sur les cellules NK, et NKp44 qui est induit après l'activation.⁵⁴² Les NCR se lient à des molécules telles que CD3δ et FcεRI-γ contenant des motifs d'activation à base de tyrosine (ITAM) qui médient la transduction du signal déclenché.⁷⁶ Deux ligands cellulaires ont été identifiés jusqu'à présent sur les cellules tumorales: le sulfate d'héparane, reconnu par tous les NCR²⁸⁹, et B7-H6 reconnu par NKp30.⁶⁵

Dans le mélanome, NKp46 joue un rôle principal dans la médiation de la lyse des cellules cibles. En effet, une corrélation entre la densité de surface de NKp46 sur les cellules NK et la lyse des cellules tumorales a été rapportée.^{639, 783} NKp30 est également un récepteur majeur impliqué dans la lyse de certaines lignées cellulaires de mélanome et peut coopérer avec NKp46 et / ou NKp44, en fonction de l'expression des ligands appropriés sur la cellule cible.⁶³³ Les lignées cellulaires de mélanome peuvent exprimer des ligands pour NKp30, NKp44⁸⁵ et NKp46.⁸⁶

Il a été suggéré que les ligands des NCR sont surexprimés dans les stades précoces de la maladie et que des variantes de tumeurs avec des niveaux d'expression plus faibles peuvent apparaître pendant la progression du mélanome.^{86, 410} De plus, l'expression de NKp30 sur les cellules NK

ainsi que la capacité de lyse des cellules de mélanome peuvent être diminuées de manière significative pour des patients atteints de mélanome métastatique.⁴⁹⁸

1.2.4.4.3- DNAM-1 et mélanome

DNAM-1 est un récepteur activateur des cellules NK appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Chez l'homme, il est exprimé sur les cellules NK, les LT, les LB, les monocytes, et les plaquettes. C'est une molécule de co-stimulation des cellules T CD8⁺ par les APC non professionnelles.²³⁷

Les ligands de DNAM-1 sont CD155 et CD112.^{61, 632, 825} Ces ligands peuvent être exprimés sur différents types de tumeurs, y compris le mélanome, la leucémie et le cancer de l'ovaire.^{90, 91, 97, 632} CD155 était présent dans la majorité des lignées de mélanome, alors que CD112 a été trouvé sur 26% des lignées.⁹⁷

La stimulation de DNAM-1, suite à son interaction avec ses ligands, conduit à la lyse des cellules cibles par les cellules NK. Dans le mélanome une collaboration entre DNAM-1 et les NCRs est souvent nécessaire pour l'activation de la lyse.^{61, 632, 825} Il a été démontré que DNAM-1 est nécessaire pour la lyse des métastases de mélanome faiblement immunogènes dépourvues des ligands de NKG2D.¹⁰⁶

1.2.4.5- Les cellules natural killer T (NKT)

Les fonctions respectives des cellules NK et NKT dans les réponses immunitaires anti-tumorales ont été parfois confondues. Cependant, la caractérisation récente des cellules NKT a permis une meilleure compréhension de leur rôle dans la réponse anti-tumorale.

L'activation des cellules NKT (CD4⁻, CD8⁻) par des agonistes puissants, tels que l' α -galactosylcéramide, a conduit à de fortes réponses anti-tumorales chez la souris.⁸⁷³ Leur effets antitumoraux sont majoritairement indirects et médiés en partie par des effecteurs en aval, tels que les macrophages associés à la tumeur qui expriment CD1d,⁷⁹⁴ les cellules NK ou l'IFN- γ qui favorise l'activation des cellules NK⁸¹⁹, plutôt que par le ciblage direct des cellules cancéreuses.

La reconnaissance directe et la lyse des cellules tumorales par les cellules NKT pourrait se faire *via* CD1d.⁵²² Dans un modèle murin de lymphome B transfecté par CD1d, il a été montré que les cellules NKT protègent les souris contre la progression de la tumeur d'une manière dépendante de CD1d.⁶⁸⁹ Cependant, la plupart des tumeurs solides et des lignées cellulaires expriment faiblement ou n'expriment pas CD1d, ce qui suggère un mécanisme indirect de lyse tumorale ou une présentation croisée avec d'autres cellules immunes.⁷⁶⁸ (Figure 11)

Les cellules NKT peuvent répondre directement à l'IL-12 dans le modèle de mélanome murin B16 et produire de l'IFN- γ , mais ne semblent pas indispensables à l'immunité anti-tumorale dans ce modèle. Leur contribution propre en absence de cellules NK n'a pas été discutée.^{613, 787} Chez l'Homme, la fréquence des cellules NKT est faible dans de nombreuses tumeurs solides dont le mélanome. Une augmentation du nombre de cellules NKT a été associée à un meilleur pronostic.^{744, 823, 826, 921} Par conséquent, l'ensemble des études chez l'Homme suggèrent que les cellules NKT peuvent avoir un rôle dans l'immunosurveillance tumorale.

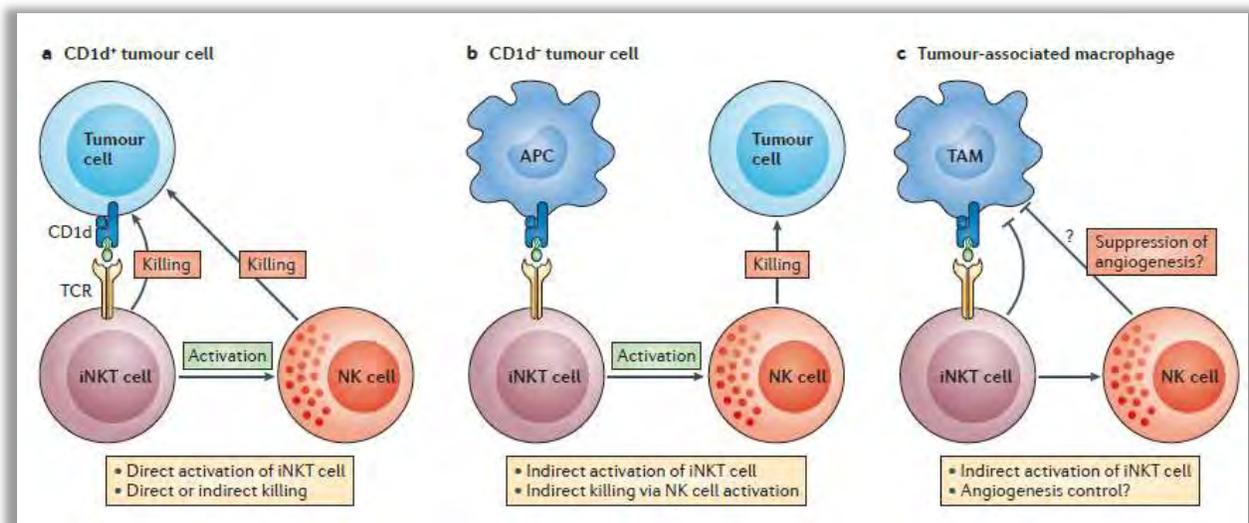


Figure 11: L'activité anti-tumorale des cellules NKT (ou iNKT: "i" pour innate).⁸⁷³ a- Les cellules tumorales qui expriment CD1d peuvent être directement reconnues par les cellules NKT. L'élimination des cellules tumorales a lieu soit directement par les cellules NKT soit indirectement via l'activation des cellules NK d'une manière dépendante des NKT. b- Certaines cellules tumorales (notamment les tumeurs solides) n'expriment pas CD1d. Dans ce cas les cellules NKT sont activées par les cellules présentatrices de l'antigène (APC) qui expriment CD1d. Les cellules NKT activées induisent ainsi l'activation des cellules NK et l'élimination des cellules tumorales par ces dernières. c- Il a également été proposé que les cellules NKT limitent la croissance tumorale en inhibant la production de facteurs pro-angiogéniques par les macrophages associés à la tumeur (TAM). TCR: T cell receptor.

1.2.4.6- Les monocytes / macrophages

Les monocytes proviennent de progéniteurs myéloïdes dans la moelle osseuse, ils sont libérés dans la circulation sanguine et migrent dans les tissus périphériques.⁵³ Après leur installation au niveau des tissus, les monocytes sont exposés à des facteurs de croissance locaux, des cytokines pro-inflammatoires, et des composés microbiens, qui les différencient en macrophages et cellules dendritiques. Certains macrophages sont tissu-spécifiques tels que les cellules de Kupffer du foie, la microglie du cerveau, les ostéoclastes osseux, et les cellules de Langerhans de la peau.³²³

Les monocytes / macrophages sont des effecteurs et régulateurs critiques de nombreux systèmes, y compris l'immunité innée et adaptative, l'hématopoïèse, l'angiogenèse, et la malignité tumorale.^{229, 555} Les macrophages sont des cellules immunitaires effectrices puissantes capables de l'élimination des virus, bactéries, champignons, et protozoaires. Ces cellules peuvent d'une part promouvoir l'initiation et la progression de la lésion tissulaire, et d'autre part améliorer la cicatrisation des plaies et le remodelage tissulaire. Ainsi, elles jouent un rôle critique dans la pathogenèse de plusieurs maladies y compris le cancer et les maladies inflammatoires et dégénératives.^{492, 493}

1.2.4.6.1- Recrutement et migration des monocytes / macrophages

Les monocytes circulants dérivés de la moelle osseuse chez l'adulte, migrent vers les tissus inflammatoires de l'organisme pour y devenir des macrophages résidents.^{250, 555} Les macrophages associés à la tumeur (TAM) sont dérivés des monocytes circulants ou des macrophages résidents dans les tissus.¹³⁵

La majorité des études cliniques associe l'infiltration des TAM à un mauvais pronostic. Une densité accrue des TAM a été associée à un faible taux de survie pour les cancers du sein, de la prostate, de l'utérus, du poumon et du foie.^{395, 437, 459, 727, 941} De même, l'augmentation du nombre de macrophages a été associée à un échec thérapeutique, une diminution de la survie sans progression ainsi qu'à un risque accru de rechute après transplantation de cellules souches hématopoïétiques autologues pour des patients atteints d'un lymphome de Hodgkin.⁸⁰⁵

La mobilisation des macrophages vers les tissus tumoraux est régulée par plusieurs signaux tels que les cytokines, les chimiokines, les composants de l'ECM et l'hypoxie.

▪ **Facteurs solubles permettant le recrutement des monocytes vers la tumeur**

Le recrutement des monocytes / macrophages dans les tumeurs est régulé par des facteurs solubles comme les cytokines, chimiokines, et facteurs de croissance qui sont dérivés de cellules tumorales et stromales. Les monocytes et les macrophages migrent vers les tissus enflammés sous l'influence de CCL2 (ou MCP-1).^{706, 936} La corrélation clinique entre l'accumulation des macrophages et le niveau de CCL2 a été démontrée dans plusieurs tumeurs humaines du sein,⁶⁶⁹ de la prostate⁵³⁵, de l'ovaire⁵⁶⁴, et du poumon.²³

Des études expérimentales ont également révélé que l'infiltration des macrophages dans les tumeurs est dépendante de CCL2.⁶⁶⁹ Par exemple, l'administration systémique d'anticorps neutralisant CCL2 chez les souris porteuses de tumeurs, ou l'inhibition par des siRNA de son récepteur CCR2 dans les lignées cellulaires réduit de façon significative la croissance tumorale et le recrutement des TAM.⁵³⁵ Cette chimiokine dérivée de tumeurs agit également comme un puissant facteur de la polarisation des macrophages et des LT vers une réponse M2/Th2.^{264, 779}

D'autres chimiokines CC y compris CCL3, CCL4, CCL5 (RANTES), et CCL22 ainsi que des chimiokines CXC, en particulier CXCL8, peuvent également être impliqués dans le recrutement des macrophages vers le site tumoral.^{282, 527, 906} De plus, plusieurs cytokines telles que CSF-1 et EMAPII ont été impliquées dans le recrutement des monocytes dans les tumeurs.^{363, 455} En effet, un niveau élevé de CSF-1 est associé à une infiltration plus importante des macrophages dans le cancer du sein métastatique.⁷⁴⁶ De même, des cellules tumorales transfectées avec le gène de CSF-1 stimulent l'infiltration des TAM comparées à des cellules contrôles.¹⁵⁶

Certains facteurs de croissance y compris le VEGF, l'endothéline-2 et le PDGF favorisent également le recrutement des monocytes et des macrophages.^{34, 551, 790}

▪ **Composants de l'ECM contrôlant le recrutement des macrophages**

L'acide hyaluronique (HA), un composante majeur de l'ECM, a récemment été impliqué dans l'infiltration des monocytes / macrophages dans la tumeur.³⁸⁴ D'autres molécules de l'ECM et leurs fragments protéolytiques agissent comme des stimuli inflammatoires induisant le recrutement des cellules immunitaires innées et l'expression des gènes pro-inflammatoires.¹¹⁶ Les fragments issus de la dégradation de l'élastine par les métalloprotéinases matricielles MMP-9/12

présentent une activité chimiotactique vis-à-vis des monocytes.³¹⁵ Le collagène I dénaturé et fragmenté, possède également une forte activité chimioattractive pour les macrophages. Alternativement, la fibronectine dérivée des TAM favorise non seulement l'invasion des cellules cancéreuses, mais aussi la migration des monocytes.⁷⁹¹

- **Recrutement des macrophages dans les zones hypoxiques**

Plusieurs travaux ont montré que les tumeurs solides de stade avancé présentent des zones hypoxiques au sein de la masse tumorale et qu'un grand nombre de TAM s'accumule dans ces domaines avasculaires.⁵⁵¹ VEGF-A⁴⁴³, l'endothéline-2²⁶⁰, EMAPII⁵⁰⁹ ainsi que la liaison de la semaphorin3A à la neuropiline-1⁹⁸ ont été impliqués dans le recrutement des macrophages vers les zones hypoxiques.

HIF-1 α est un facteur de transcription clé qui régule l'expression génique en réponse à l'hypoxie.^{79, 830} Il induit aussi l'expression du récepteur CXCR4 sur les monocytes et les macrophages et augmente la réponse chimiotactique à son ligand CXCL12.⁷⁴¹ HIF-1 α induit également l'expression de CXCL12 dans les sites hypoxiques.¹⁰¹ Plusieurs groupes ont rapporté que l'hypoxie induit l'expression de VEGF-A dans les TAM d'une manière dépendante de HIF-1 α .¹⁸⁴ D'autre part, l'hypoxie peut séquestrer les TAM dans les zones hypoxiques par l'induction de MKP-1, une MAP kinase phosphatase qui inhibe les voies de signalisation ERK1/2 et p38 MAP kinase.²⁵⁹ L'hypoxie inhibe également l'expression des récepteurs aux chimiokines CCR5 et CCR2 sur les macrophages et la migration cellulaire en réponse à leurs ligands.⁷⁷⁷

1.2.4.6.2- Polarisation des macrophages

Les macrophages sont caractérisés par leur diversité et plasticité. En réponse à des divers signaux environnementaux, les macrophages peuvent subir une activation classique M1 (stimulée par l'IFN- γ et les ligands des TLRs) ou alternative M2 (stimulée par l'IL-4 / IL-13). Ces états reflètent la polarisation Th1-Th2 des cellules T.^{52, 495}

Le phénotype M1 est caractérisé par l'expression de niveaux élevés des cytokines pro-inflammatoires, la production intense des intermédiaires réactifs de l'oxygène et de l'azote, la promotion de la réponse Th1, et une forte activité microbicide et tumoricide. En revanche, les

macrophages M2 possèdent des fonctions immunorégulatrices et sont impliqués dans l'inclusion des parasites, le remodelage tissulaire et la progression tumorale. Le phénotype M2 des macrophages est caractérisé par une activité phagocytaire efficace, une expression élevée des récepteurs éboueurs (scavenger receptors), l'expression des récepteurs au mannose et au galactose, la production de l'ornithine et de polyamines à travers la voie de l'arginase, et un phénotype IL-12^{lo}IL-10^{hi}IL-1decoyR^{hi}IL-1RA^{hi}.^{249, 495} Les macrophages M1 et M2 diffèrent également par leurs profils d'expression de chimiokines.

Les signaux comme l'IL-10, les hormones glucocorticoïdes, les molécules libérées par les cellules apoptotiques, et les complexes immuns affectent profondément les fonctions des monocytes / macrophages. Ces signaux induisent l'expression de phénotypes intermédiaires, « M2-like », qui présentent des propriétés communes avec les cellules M2 (*i.e.* l'expression accrue des récepteurs au mannose et des récepteurs éboueurs), et distinctes en ce qui concerne le répertoire de chimiokines.⁵²

La plasticité et la flexibilité sont des caractéristiques clés des phagocytes mononucléaires et de leur état d'activation.^{52, 495, 544} La polarisation M1-M2 des macrophages peut, dans certaines conditions, être inversée *in vitro* et *in vivo*.^{266, 722} Les pathologies sont fréquemment associées à des changements dynamiques dans l'activation des macrophages, avec les cellules M1 impliquées dans l'initiation et le maintien de l'inflammation, et les cellules M2 ou M2-like associées à la résolution de cette dernière.⁵⁰⁴ Les cellules T (Th1, Th2, Treg) qui régulent la polarisation des macrophages⁵² ont également montré une plasticité cellulaire.⁵⁸⁰

- **Déterminants moléculaires de la polarisation des macrophages**

Un réseau de molécules de signalisation, de facteurs de transcription, de mécanismes épigénétiques et post-transcriptionnels, régule les différentes formes d'activation des macrophages. (Figure 12)

Les interférons ainsi que le signal des TLR orientent la polarisation des macrophages vers le phénotype M1 via STAT1. Les macrophages M1 régulent positivement IRF5, qui est essentiel pour l'induction des cytokines IL-12, IL-23, et TNF impliquées dans les réponses Th1 et Th17.³⁹⁷ L'IL-4 et l'IL-13 orientent la polarisation des macrophages vers le phénotype M2 via STAT6.⁷⁷⁶

STAT6 active la transcription des gènes typiques de la polarisation M2, tels que le récepteur du mannose (MRC1, CD206), la résistine-like α (Retnla, Fizz1), et la chitinase 3-like 3 (Chi3l3, YM1).⁶²² L'IL-10 active l'expression, médiée par STAT3, des gènes (IL10, TGF- β 1, MRC1) associés à un phénotype M2-like.^{247, 415, 495}

L'activation médiée par STAT des macrophages est modulée par les membres de la famille SOCS. L'IL-4 et l'IFN- γ régulent positivement SOCS1 et SOCS3, qui à leur tour inhibent l'action de STAT1 et STAT3, respectivement.^{464, 892} En parallèle, les récepteurs nucléaires PPAR γ ⁵⁸² et PPAR δ ^{362, 581} contrôlent un ensemble de gènes associés à l'activation des macrophages M2 et au métabolisme oxydatif. STAT6 coopère avec PPAR γ ⁸²¹ et le facteur Krüppel-like 4 (KLF4), pour réguler les fonctions des macrophages.^{89, 450} KLF4 coopère avec STAT6 pour induire les gènes associés au phénotype M2 (ARG-1, MRC1, Fizz1, PPAR γ) et inhiber des gènes du phénotype M1 (TNF- α , COX-2, CCL5, iNOS) *via* la séquestration des coactivateurs nécessaires à l'activation de NF- κ B. KLF2 empêche aussi l'orientation vers le phénotype M1 par l'inhibition de NF- κ B et de HIF-1 α .⁴⁸¹ L'IL-4 induit également une activité c-Myc qui permet l'activation de PPAR γ , STAT6 et la transcription des gènes M2.⁶³¹

L'engagement des TLR conduit à l'activation de NF- κ B et la production de médiateurs inflammatoires caractéristiques du phénotype M1 des macrophages.⁵⁷ D'autre part, l'induction de NF- κ B active aussi un programme génétique essentiel pour la résolution de l'inflammation et la polarisation M2 des macrophages associés aux tumeurs (TAM).^{269, 425}

Les facteurs induits par l'hypoxie HIF-1 α et HIF-2 α sont exprimés de manière différentielle dans les macrophages et régulent le métabolisme de l'arginine dans ces cellules en induisant l'iNOS et l'arginase caractéristiques des phénotypes M1 et M2, respectivement.⁸²⁹

Les changements épigénétiques et les ARN non codants participent également à la polarisation des macrophages.^{339, 674, 737} L'IL-4 induit une régulation positive de l'histone déméthylase JMJD3 dans les macrophages murins, ce qui permet la modification de la chromatine en faveur de l'expression des gènes M2 et l'inhibition des gènes M1. Le micro ARN miR-155 a récemment été identifié pour cibler la sous-unité IL-13R α 1 du récepteur de l'IL-13, diminuant ainsi l'expression d'un ensemble de gènes associés au phénotype M2 des macrophages humains.⁵⁰³

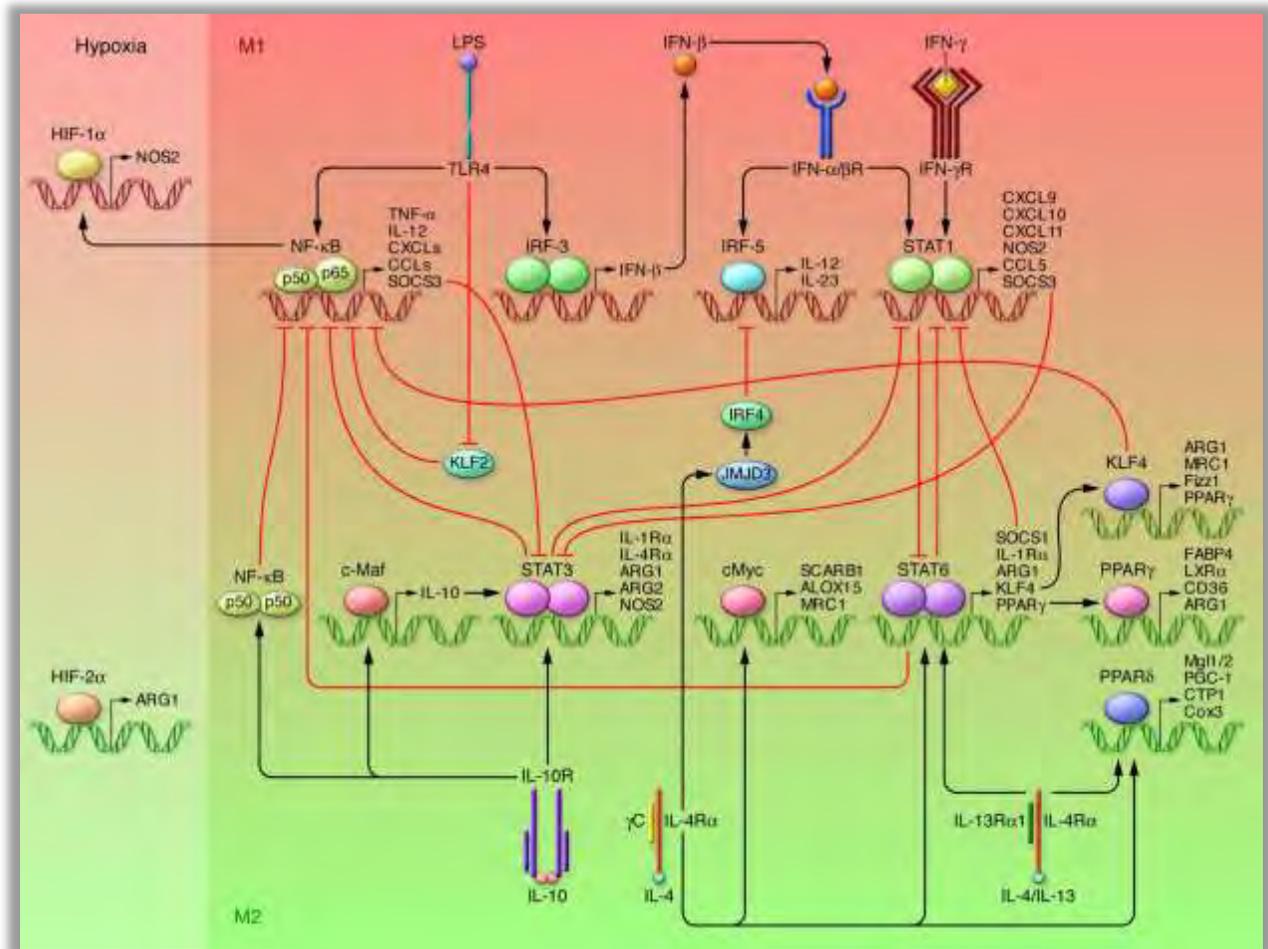


Figure 12: Mécanismes de polarisation des macrophages.⁷⁷⁵ Les principales voies de signalisation impliquées dans la polarisation des macrophages ainsi que le dialogue M1-M2 sont décrits.

▪ **Polarisation des macrophages et cancer**

Le microenvironnement tumoral oriente souvent la polarisation des macrophages de l'état M1 qui possède des propriétés pro-inflammatoires et anti-tumorales à l'état M2 qui possède des propriétés anti-inflammatoires, pro-angiogéniques, et pro-tumorales.⁶⁷⁰ Le phénotype spécifique des TAM dépend du stade tumoral.⁹³² Dans les stades précoces ou dans les tumeurs en régression, les TAM ont un phénotype M1 caractérisé par l'inhibition de l'angiogenèse et l'activation de l'immunité anti-tumorale. Les TAM passent à un état M2-like dans les tumeurs de stade avancé et stimulent l'angiogenèse tumorale.^{248, 932} (Figure 13)

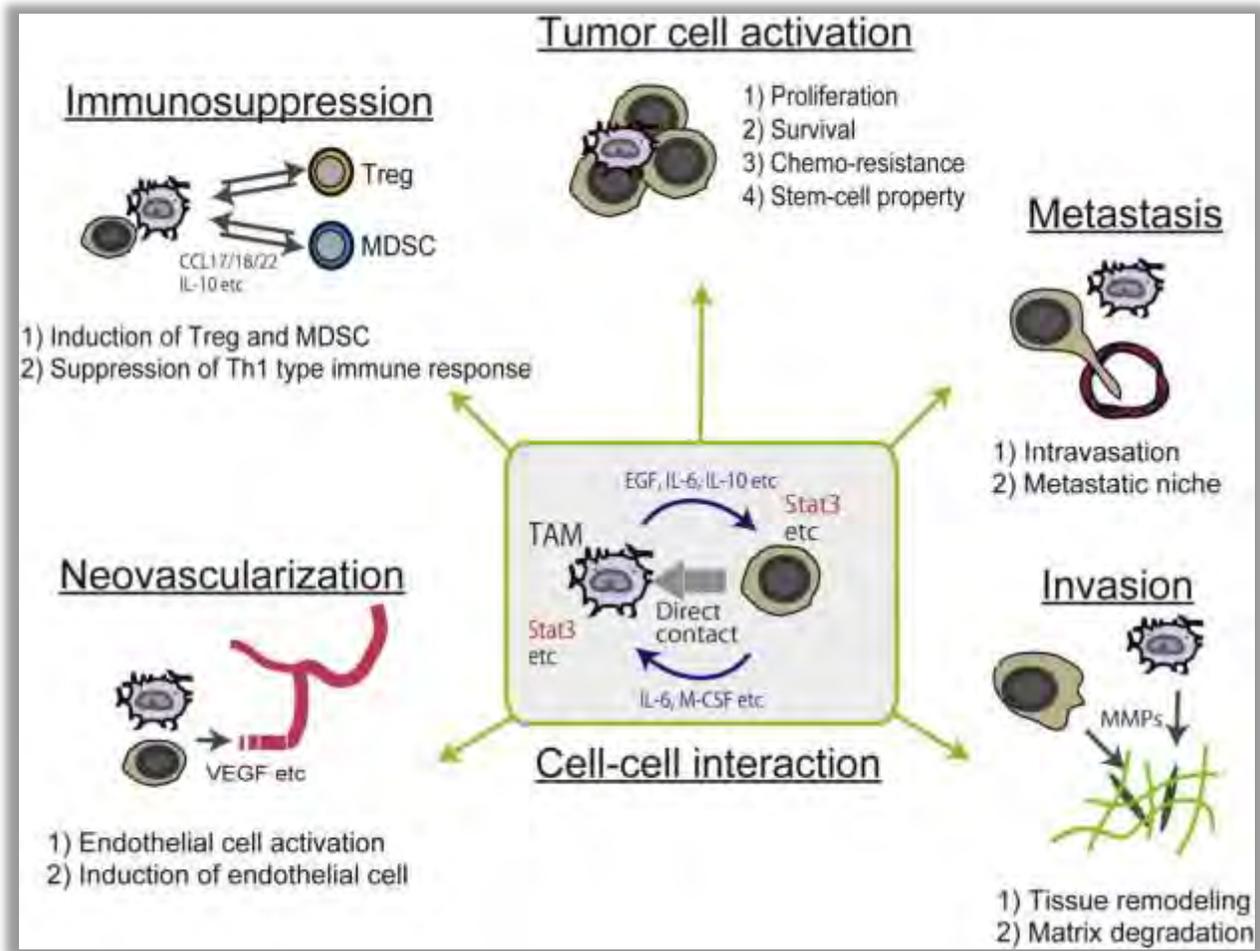


Figure 13: Promotion de la progression tumorale par les TAM.³⁸⁹

- Promotion de l'angiogenèse tumorale par les macrophages

La polarisation des macrophages vers le phénotype pro-angiogénique est régulée par l'hypoxie et les différents signaux provenant des cellules tumorales et stromales.^{546, 778} Des travaux récents ont suggéré que le switch angiogénique dans les tumeurs dépend de l'infiltration des macrophages.^{183, 550, 560} De même, la déplétion sélective des macrophages en utilisant le clodronate encapsulé dans des liposomes réduit l'angiogenèse dans un modèle de tumeur transplantée.³⁸⁴

Les TAM sécrètent une grande variété de médiateurs pro-angiogéniques, y compris le bFGF, la thymidine phosphorylase, l'uPA, et l'adrénomédulline (ADM). De façon intéressante, les TAM produisent de l'ADM quand ils interagissent avec les cellules de mélanome. L'ADM stimule

également la prolifération des cellules endothéliales et la formation des tubes vasculaires en induisant la synthèse endothéliale de l'oxyde nitrique.¹¹² De plus, les TAM, qui sont sensibles à l'hypoxie dans les zones avasculaires des tumeurs, sécrètent du VEGF-A, un facteur pro-angiogénique très puissant.^{420, 443} Ce VEGF-A contribue à l'initiation de l'angiogenèse tumorale et à l'augmentation du nombre des vaisseaux dans les tumeurs solides. En l'absence des macrophages, cette angiogenèse est retardée.⁵¹

Les TAM sécrètent également des enzymes protéolytiques induites par l'hypoxie telles que MMP-1⁵⁵² et MMP-7.⁸⁰ Les monocytes, qui sont recrutés dans les tumeurs pendant l'hypoxie facilitent l'angiogenèse tumorale par la sécrétion de MMP-9.¹⁶⁰ Ces MMP séquestrent le VEGF de l'ECM pour accélérer l'angiogenèse tumorale.

Les monocytes exprimant le récepteur TIE2 de l'angiopoïétine (TEM) sont un sous-ensemble de monocytes circulants et infiltrant les tumeurs. Ils expriment des niveaux élevés de VEGF-A et de MMP-9 pro-angiogénique. Tout comme les TAM, ils favorisent l'angiogenèse tumorale mais avec un potentiel angiogénique plus important lors de leur co-inoculation avec des cellules tumorales chez la souris.^{124, 141} L'angiopoïétine-2, qui est sécrétée par les cellules tumorales et le système vasculaire, induit un phénotype M2-like chez les TEM via la régulation positive de l'expression de l'IL-10¹²⁴ et l'inhibition de l'expression du TNF- α et de l'IL-12.⁵⁵³

- Promotion de l'invasion et des métastases tumorales par les macrophages

Les TAM affectent directement et indirectement le processus métastatique des cellules tumorales en modulant le microenvironnement de la tumeur.^{442, 729} Wyckoff et ses collègues ont démontré par l'imagerie multi-photonique en temps réel que l'extravasation des cellules tumorales se produit en association avec les TAM dans les tumeurs mammaires.⁹⁰⁸ Les cellules tumorales synthétiseraient du CSF-1 permettant le recrutement des macrophages qui eux-mêmes produiraient de l'EGF améliorant ainsi l'invasion des cellules tumorales. L'inhibition du CSF-1 ou de l'EGF inhiberait alors la migration des deux types cellulaires.⁹⁰⁷

De plus, les macrophages sont la principale source de diverses enzymes protéolytiques telles que les cathépsines, les MMP et les sérine protéases. Ces protéases dérivées des macrophages dégradent l'ECM environnante et permettent ainsi aux cellules cancéreuses d'envahir cette

barrière. En effet, la déplétion des cathépsines B et S dérivées des TAM diminue l'invasion tumorale.²⁴² De même, les TAM augmentent de manière significative la migration et l'invasion des cellules cancéreuses en exprimant fortement l'uPA.¹²

- *Contribution des macrophages à la formation de la niche pré-métastatique*

L'invasion métastatique se fait en plusieurs étapes et nécessite des interactions entre la tumeur primaire et les organes qui seront colonisés. En effet, avant que les cellules tumorales métastatiques colonisent les organes secondaires, ces derniers subissent des changements précoces dans leur microenvironnement local, appelé la «niche pré-métastatique». Une étude récente a montré que le recrutement des macrophages par le facteur de coagulation III (CD142) est une étape importante pour la survie des cellules métastatiques et la formation de la niche pré-métastatique.²³⁶

De même, la lysyl oxydase (LOX), une amine oxydase sécrétée par les cellules tumorales qui forme un réseau de collagène IV dans la membrane basale de la niche pré-métastatique, est importante pour la séquestration des cellules myéloïdes CD11b⁺ dans ce réseau. Les cellules myéloïdes CD11b⁺ adhèrent ensuite au réseau de collagène IV et produisent MMP-2. Les peptides issus du clivage du collagène IV par MMP-2 améliorent le recrutement ultérieur de cellules CD11b⁺ en agissant comme un agent chimioattractif.¹⁸¹ Cette boucle de rétrocontrôle positif augmente le remodelage de la matrice extracellulaire et la création de la niche pré-métastatique.

Les protéines S100A8 et S100A9 pourraient également jouer un rôle crucial dans la formation de la niche pré-métastatique. Elles induisent le recrutement des cellules myéloïdes Mac1⁺ dans la niche pré-métastatique ainsi que la migration des cellules cancéreuses des tumeurs primaires vers les sites métastatiques.²⁹⁹

- *Immunosuppression du microenvironnement tumoral médiée par les TAM*

L'échappement des cellules tumorales à l'immunosurveillance est l'un des événements critiques qui régulent la croissance, la survie, et les métastases tumorales. Les TAM de phénotype M2 possèdent une faible capacité de présentation antigénique et suppriment la réponse immunitaire

des cellules T en libérant les facteurs immunosuppresseurs, tels que l'IL-10 et le TGF- β .³⁹⁸ La sécrétion de TNF- α et d'IL-10 par les monocytes activés induit fortement l'expression du ligand de mort cellulaire programmée 1 (PD-L1) par ces derniers. Les monocytes PD-L1⁺ induisent le dysfonctionnement des lymphocytes T, défini par une faible cytotoxicité contre les cellules tumorales et une réduction de la prolifération des cellules T.³⁹⁹ Le blocage de PD-L1 avec un anticorps spécifique améliore la réponse des cellules T, ce qui suggère que PD-L1 limite la capacité des lymphocytes T à éliminer les cellules tumorales.

Une augmentation du nombre de cellules T régulatrices (T reg) a été rapportée dans diverses tumeurs.^{37, 131, 241, 338} Les cellules T régulatrices CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ infiltrant les tumeurs s'opposent aux réponses immunitaires médiées par les LT. Dans le carcinome ovarien humain, les TAM produisent le CCL22, qui par sa liaison au CCR4, permet la mobilisation intratumorale des T reg.^{131, 330, 534}

- TAM, cellules souches du cancer et résistance chimiothérapeutique

Les cellules souches du cancer (CSC) représentent une population de cellules cancéreuses qui possèdent la capacité d'auto-renouvellement et de génération de descendants malignes. Les CSC régissent également la récurrence tumorale en raison de leur résistance aux agents chimiothérapeutiques.^{122, 147}

Les TAM contrôlent à la fois l'auto-renouvellement et la chimiorésistance des CSC à travers un réseau complexe de cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, et molécules de la matrice extracellulaire. Par exemple, l'EGF produit par les TAM induit le phénotype CSC-like dans le cancer du sein murin et permet le maintien de ce phénotype.⁹²²

A l'inverse, les SC de gliome produisent des niveaux élevés de chimiokines tels que CCL2 qui permet le recrutement des TAM vers le site de la tumeur.⁹²⁷

Les composants de l'ECM peuvent également moduler la fonction de TAM pour soutenir l'auto-renouvellement des CSC. Par exemple, l'acide hyaluronique produit par le cancer du sein métastatique favorise l'interaction entre les TAM et les CSC. Ceci est suivi par la sécrétion de PDGF-BB par les TAM, ce qui permet aux fibroblastes et ostéoblastes de soutenir l'auto-renouvellement des CSC par l'induction de l'expression des facteurs de croissance FGF-7 et 9.⁵⁹¹

1.2.4.7- Les lymphocytes

Les premières études corrélatives réalisées chez des patients atteints de mélanome ont démontré que l'infiltration des lymphocytes dans la tumeur est associée à un meilleur pronostic et une survie plus longue.^{121, 423, 609} En particulier, les lymphocytes T CD8⁺ et T CD4⁺ de phénotype Th1 sont le plus souvent liés à un bon pronostic.^{209, 866} Les autres sous-populations de cellules T notamment Th2 et Th17, et Treg sont corrélées à un pronostic variable.²⁰⁹ En effet, les Treg sont dotées de fonctions immunosuppressives qui s'opposent à l'action des cellules effectrices⁸⁴⁷, tandis que les cellules Th17 peuvent exercer des activités pro- ou anti-tumorigènes selon le type de la tumeur.^{32, 896}

Etant donné que plusieurs sous-populations de cellules immunitaires sont simultanément présentes dans le microenvironnement tumoral, leurs rapports relatifs peuvent renseigner sur l'équilibre entre les réponses pro- et anti-tumorales. Ainsi, les rapports T CD8⁺ / T reg ou T CD4⁺ totaux ont pu donner une indication pronostique dans les cancers de l'ovaire, du pancréas et le cancer colorectal.^{148, 336, 657, 734}

1.2.4.7.1- Les lymphocytes T auxiliaires (Th)

Les lymphocytes T auxiliaires (Th) jouent un rôle clé dans le système immunitaire adaptatif exerçant des fonctions biologiques diverses. Ces cellules T CD4⁺ régulent à la fois la réponse cellulaire cytotoxique dépendante des cellules T CD8⁺, et la réponse humorale traduite par la production d'anticorps dépendante des cellules B. Les acteurs de la réponse immunitaire adaptative interagissent avec les composants du système immunitaire inné décrits dans les points précédents pour répondre aux stimuli antigéniques. Les cellules naïves CD4⁺ peuvent être activées par le peptide antigénique présenté par une molécule de CMH de classe II d'une APC, pour se différencier par la suite en cellules T effectrices ou mémoires. Selon l'intensité de la stimulation et la présence de certains facteurs et cytokines, les cellules T CD4⁺ peuvent se différencier en diverses sous-populations de cellules Th avec des fonctions et propriétés spécifiques.³⁹⁴ Cette spécialisation fonctionnelle est régulée par des facteurs de transcription activés en réponse aux stimuli spécifiques, elle permet l'expression de configurations distinctes de facteurs solubles et de molécules de surface.

- **Les lymphocytes Th1**

Les lymphocytes Th1 sont induits en réponse à l'IFN- γ et l'IL-12 dont les signaux sont médiés par STAT1 et STAT4. Les lymphocytes Th1 expriment le facteur de transcription T-bet et sont caractérisés par la production de l'IFN- γ , ce qui renforce à son tour la polarisation Th1, créant une boucle de rétrocontrôle positif.^{2, 182}

La stabilité relative du phénotype Th1 peut être expliquée par le fait que T-bet peut induire sa propre expression et supprimer le facteur de transcription GATA-3, responsable de la différenciation Th2.^{5, 547, 583}

- **Les lymphocytes Th2**

Les lymphocytes Th2 sont induits en présence de IL-4, qui antagonise la polarisation Th1, par l'intermédiaire de STAT6. Le facteur de transcription impliqué dans la polarisation Th2 est GATA-3, qui est comme T-bet capable de s'auto-activer, fournissant une boucle de rétrocontrôle positif.⁶⁰³ GATA-3 et T-bet sont caractérisés par l'antagonisme mutuel, ce qui favorise l'orientation instable des lymphocytes vers les phénotypes Th1 ou Th2.⁵⁵⁴ Les lymphocytes Th2 expriment les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 qui sont impliquées dans les réactions allergiques et les réponses immunitaires humores aux agents infectieux et aux parasites.^{629, 705, 769}

- **Les lymphocytes Th17**

L'orientation des lymphocytes CD4⁺ vers le phénotype Th17 se produit en présence d'IL-6, d'IL-21 et de TGF- β .^{46, 924} Leur différenciation est régulée par les voies STAT3, SMAD et ROR γ t (RORc chez l'homme) et ROR α .^{298, 342, 925} Ces cellules expriment l'IL-17, l'IL-21, l'IL-22, et le GM-CSF.³⁹⁴ L'IL-23 est important pour la survie et le potentiel inflammatoire des cellules Th17, il joue un rôle dans des pathologies auto-immunes humaines.⁴¹⁶

Les cellules Th17 sont présentes dans des circonstances normales, en particulier dans l'intestin, où elles assurent une protection contre les infections bactériennes et fongiques, mais sont régulées à la hausse dans l'intestin et d'autres tissus lors de l'inflammation.^{343, 344, 602}

- **Les lymphocytes Treg**

La sous-population Treg est contrôlée par le facteur de transcription Foxp3 en réponse au TGF- β exprimé par différentes cellules régulatrices.³⁵⁸ Pour plus de caractérisation, les lymphocytes Treg expriment CD25 (IL-2R α) et présentent un faible niveau de CD127 (IL-7R) et un niveau élevé du récepteur de folate 4, qui peuvent être utilisés comme des marqueurs de distinction de ce type cellulaire.^{870, 939}

Les cellules Treg jouent un rôle clé dans le maintien de la tolérance périphérique. Elles s'opposent à l'action des cellules T effectrices et des cellules présentatrices de l'antigène par les interactions cellule-cellule et la libération de cytokines suppressives, tels que TGF- β et l'IL-10.^{708, 723, 724} Leur dysfonctionnement a été associé à différentes pathologies auto-immunes, y compris la sclérose en plaques, le diabète de type I, et le psoriasis.^{31, 457, 680}

- **Les lymphocytes Th9**

Une population de cellules productrices d'IL-9 a d'abord été décrite dans les années 1980.⁸⁵⁵ La différenciation et la fonction des cellules Th9, ainsi que leur rôle possible dans l'allergie et les maladies auto-immunes, a récemment été décrit.³⁶⁴

La génération des lymphocytes Th9 à partir de cellules T CD4⁺ naïves et la production de l'IL-9 sont stimulées par l'addition de TGF- β et la présence de l'IL-4 ou de l'IL-2. D'autres cytokines, notamment l'IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-21 et IL-25, favorisent aussi la production de l'IL-9, alors que l'IL-27 l'inhibe.³⁴⁹

Une production élevée de l'IL-9 et la différenciation en lymphocytes Th9 ont été démontrées dans des modèles murins d'allergie et de mélanome.^{357, 665} Sur le plan fonctionnel, l'IL-9 favorise la survie et la prolifération des lymphocytes T et des mastocytes qui exercent une cytotoxicité envers les cellules tumorales, elle stimule aussi la production de plusieurs cytokines, et module les réponses des cellules B. Une production élevée de l'IL-9 joue un rôle important dans les réponses auto-immunes, l'allergie et l'immunité anti-tumorale.³⁴⁹ Les cellules Th9 produisent également l'IL-10 et l'IL-21, dont les fonctions à ce niveau restent à élucider.

- **Les lymphocytes Th22**

L'IL-22 est un membre de la famille de l'IL-10 produit par divers types de lymphocytes T activés, y compris les cellules Th17, les cellules CD8⁺ et les cellules immunitaires innées. Les lymphocytes Th22 expriment l'IL-22, mais pas d'IL-17 ni l'IFN- γ .^{163, 848}

La différenciation des cellules Th22 à partir des cellules T CD4⁺ naïves est induite par le TNF- α et l'IL-6, elle est également favorisée par l'IL-1 β .²¹¹ La production de l'IL-22 a été augmentée dans plusieurs maladies auto-immunes, inflammatoires, et allergiques, où cette cytokine joue des rôles protectifs ou pathogéniques dépendant du contexte et de la phase de la maladie.³⁴⁸ L'augmentation des cellules Th22 et de la production d'IL-22 ont été rapportées dans plusieurs types de tumeurs, d'où l'importance du ciblage de l'axe Th22 / IL-22 dans la thérapie anti-tumorale.^{348, 350, 386, 942}

- **Plasticité des lymphocytes Th et cancer**

Les lymphocytes Th1 et Th17 jouent un rôle crucial dans la réponse antitumorale, ils produisent des cytokines inflammatoires et participent à la cytotoxicité à médiation cellulaire des cellules tumorales.⁸⁶⁶ Ces réponses, cependant, peuvent être supprimées par les cellules Treg qui sont également recrutées lors de la croissance tumorale.⁸⁰⁴ (Figure 14)

Dans les premières étapes de la progression tumorale, les Treg sont concentrées dans la masse tumorale où elles inhibent localement les réponses immunitaires effectrices.⁵⁴⁵ À des stades ultérieurs, la population des Treg est régulée à la hausse au niveau systémique, où elle exerce une activité immunosuppressive envers la réponse immune dirigée contre les métastases.⁸⁵³ Il a été démontré que l'appauvrissement systémique en cellules Treg permet la régression des métastases de mélanome.⁶⁸² Le ciblage des Treg des tumeurs, semble être une option thérapeutique prometteuse contre le cancer.^{233, 685}

Le rôle des lymphocytes Th17 dans le cancer a été très longtemps discuté.³² Il a été démontré que les cellules Th17 infiltrent les tumeurs et leurs concentrations y sont très élevées en comparaison avec les tissus environnants montrant un rôle potentiel de ces cellules dans le développement tumoral.^{506, 816, 935} L'accumulation des cellules Th17 a été associée à une amélioration de la survie des patients dans certains types de cancer et à un mauvais pronostic dans d'autres types de

tumeurs.^{353, 413} En effet, les lymphocytes Th17 peuvent stimuler l'inflammation locale par la production d'IL-17 et d'IFN- γ permettant par conséquent la croissance, dépendante de l'inflammation, des cellules tumorales. Un rééquilibrage en faveur de la différenciation Th1 plutôt que Th17 entraîne une réduction de la population de cellules Th17, inhibe l'inflammation ainsi que la croissance tumorale dans un modèle murin de cancer du pancréas.⁵⁰⁰

De plus, les lymphocytes Th17 et la sécrétion de l'IL-17A sont capables d'induire l'angiogenèse tumorale,⁵⁷⁵ cependant, d'autres cytokines produites par ces cellules (IL-17F, IL-21 et IL-22) présenteraient des propriétés anti-angiogéniques^{99, 845, 884} Il est donc probable que les lymphocytes Th17 pourraient acquérir des propriétés et des modes de production de cytokine différents selon microenvironnement de la tumeur.

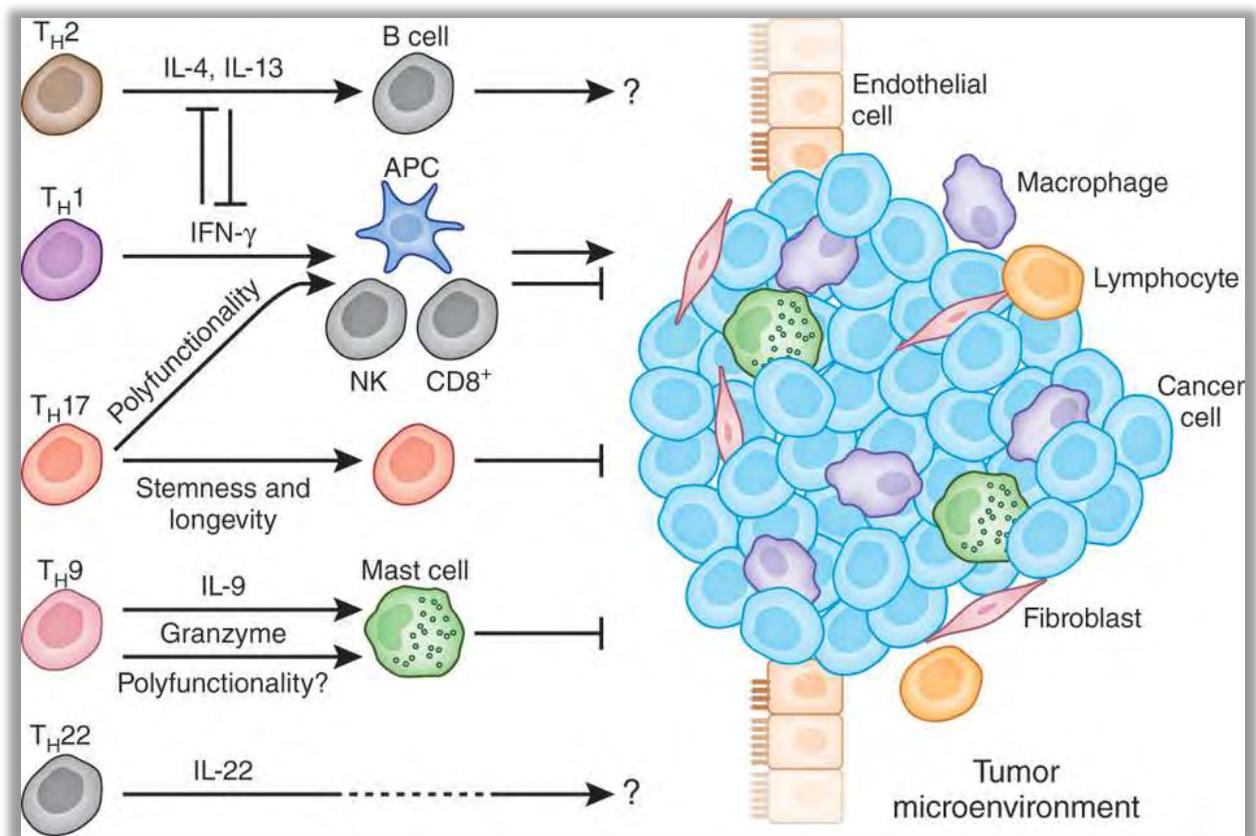


Figure 14: Différentes sous-populations de lymphocytes T auxiliaires présentes dans le microenvironnement tumoral.⁹⁴⁷

1.2.4.7.2- Les lymphocytes T cytotoxiques (Tc ou CTL)

Les lymphocytes T CD8⁺ naïfs se différencient, après la reconnaissance antigénique, en lymphocytes T mémoires et en lymphocytes T effecteurs ou cytotoxiques (CTL) qui présentent l'activité cytotoxique majeure. Des propriétés phénotypiques et fonctionnelles différencient les lymphocytes naïfs, mémoires et effecteurs. Parmi les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, on distingue des lymphocytes effecteurs mémoires (CCR7⁻CD45RA⁻) et des lymphocytes effecteurs de différenciation terminale (CCR7⁻CD45RA⁺).⁷²⁵

La lyse de la cellule cible s'effectue par la reconnaissance via le TCR des peptides antigéniques associés aux molécules de CMH-I. La molécule CD8 est costimulatrice du TCR, elle reconnaît des domaines non polymorphiques du CMH-I. D'autres molécules de costimulation, tels que CD27 et CD28, reconnaissent des ligands, CD70 et CD80/86, présents sur les cellules présentatrices de l'antigène. Le phénotype CD27⁻CD28⁻CD57⁺CCR7⁻CD45RA⁺ comprend l'essentiel de l'activité cytotoxique T.⁶⁹⁰ Outre le TCR qui permet une reconnaissance spécifique de l'antigène, les lymphocytes T CD8⁺ expriment également le récepteur activateur de la famille lectine C, NKG2D. L'interaction de NKG2D avec ses ligands augmente les réponses cytotoxiques des CTL *in vitro*.²⁶³

L'activité cytotoxique des CTL implique essentiellement deux voies: la voie perforine/ granzyme et la voie impliquant le couple Fas (CD95) / Fas ligand, membre de la superfamille du TNF-R. La cytotoxicité médiée par la perforine implique une exocytose de granules au contact de la cellule cible par une voie dépendante du calcium. Les molécules de perforine se polymérisent pour former un canal dans la membrane de la cellule cible permettant l'entrée des molécules de granzyme qui sont des sérines protéases.^{690, 731} Les granzymes vont amorcer la cascade de l'apoptose en activant les caspases entraînant la mort de la cellule cible. La cytotoxicité induite par les membres de la famille TNF / TNF-R s'effectue par l'interaction directe entre le récepteur Fas et son ligand Fas L via une signalisation faisant intervenir les « domaines de mort » présents dans la partie cytoplasmique du récepteur.⁷³¹

L'infiltration des lymphocytes T CD8⁺ activés dans les tumeurs a été corrélée à de meilleurs résultats cliniques dans différents cancers tels que le carcinome rénal.⁵⁵⁹ Les cellules T CD8⁺ CD45RO⁺, un marqueur des cellules T mémoires, ont été associées à la fois à l'expression accrue

de gènes de cytotoxicité mais aussi au pronostic positif de patients atteints de cancer colorectal.^{222, 606}

Dans le mélanome, plusieurs études ont montré que les patients portent des cellules T monoclonales capables de reconnaître les cellules tumorales. Leur fonction et leur spécificité antigénique ont été étudiées après isolement et clonage, soit à partir du sang périphérique, des ganglions lymphatiques de drainage, ou bien des tissus tumoraux eux-mêmes.⁵⁸ De façon intéressante, la localisation précise des cellules T CD8⁺ au sein du mélanome modifie également leur signification pronostique, plus la tumeur est infiltrée par les CTL (immunotype C) et plus le pronostic est bon.¹⁷⁷

1.2.4.7.3- Les lymphocytes T $\gamma\delta$

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ expriment un TCR composé d'une chaîne γ et d'une chaîne δ .²⁸⁸ Leur répertoire de reconnaissance antigénique est plus limité que celui des lymphocytes T $\alpha\beta$. Ils reconnaissent des antigènes tels que les protéines du choc thermique ou des ligands non peptidiques phosphorylés naturels ou synthétiques. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ majoritaires n'expriment pas les molécules CD4 et CD8. La molécule CD8 est exprimée par 30 % des lymphocytes T $\gamma\delta$ et le CD4 par <5 % des lymphocytes T $\gamma\delta$.⁶⁹⁰

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sécrètent des cytokines (IFN- γ , TNF- α ou IL-4), expriment la perforine et Fas- L et exercent également une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Certains lymphocytes T $\gamma\delta$ expriment le récepteur NK activateur NKG2D, dont l'engagement par ses ligands augmente la réponse TCR-dépendante.²⁶¹ Ils expriment aussi des récepteurs inhibiteurs de type KIR qui constituent un moyen de protection contre les lymphocytes T $\gamma\delta$ les plus cytotoxiques.¹⁹⁵

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont impliqués dans la défense anti-infectieuse et antitumorale ainsi que dans des maladies auto-immunes ou inflammatoires. La réponse antitumorale des lymphocytes T $\gamma\delta$ intéresse plutôt les tumeurs solides d'origine épithéliale qui expriment des ligands de NKG2D (MICA/B et ULBP).²⁶² En effet, l'interaction de NKG2D avec ses ligands a un puissant effet antitumoral.²³⁸

1.2.4.7.4- Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont les acteurs principaux de l'immunité humorale. Après leur activation, ces cellules permettent la génération de cellules B mémoires et de plasmocytes qui produisent les anticorps de haute affinité, essentiels pour la réponse immunitaire de l'hôte. L'activation et la différenciation des cellules B dépendent de (i) la nature de l'antigène (polysaccharide, glycolipide, ou protéine), (ii) les signaux des TLRs; et (iii) les signaux auxiliaires et costimulateurs des cytokines.⁵⁷⁷

En plus de leur rôle évident dans l'immunité humorale, il est maintenant établi que les lymphocytes B contribuent également à l'immunité cellulaire par l'intermédiaire d'au moins trois mécanismes: (i) ils servent de cellules présentatrices d'antigène qui améliorent la réponse médiée par les lymphocytes T, (ii) ils fonctionnent comme des effecteurs cellulaires qui produisent des cytokines inflammatoires, et (iii) ils modulent les réponses immunitaires par la sécrétion d'IL-10 (sous-population B reg).^{103, 470}

Durant la carcinogenèse, les cellules B produisent des anticorps dirigés contre les antigènes tumoraux pour favoriser la régression tumorale, ou contre des composants de l'ECM. Dans ce dernier cas la reconnaissance des complexes immuns formés induit l'angiogenèse et le recrutement vers la tumeur de macrophages de phénotype M2 de façon dépendante du récepteur FcγR.²⁰ Ces macrophages M2 peuvent participer à la progression tumorale soit directement ou par l'intermédiaire des fibroblastes. L'IL-1 dérivé des macrophages incite les fibroblastes à recruter plus de macrophages et favoriser l'angiogenèse.¹⁷⁹ Des stratégies ciblant les cellules B et l'IL-1 sont actuellement en essai clinique et pourront fournir des informations pertinentes sur la diversité des réponses inflammatoires liées au cancer, ainsi que de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes.¹⁴⁹ L'induction de la carcinogenèse et des métastases, dépendante des macrophages M2, peut aussi être induite par la sécrétion de l'IL-4 par les cellules Th2, comme démontré dans un modèle murin de cancer du sein.^{144, 491}

Les lymphocytes B agissent non seulement sur le recrutement des TAM mais aussi sur leur polarisation vers un phénotype M2-like, favorisant ainsi la croissance du mélanome B16 transplanté chez la souris. Cette polarisation vers l'état M2-like est induite par la sécrétion constitutive de l'IL-10 par la sous-population B-1 des lymphocytes B.⁹⁰¹ (Figure 15)

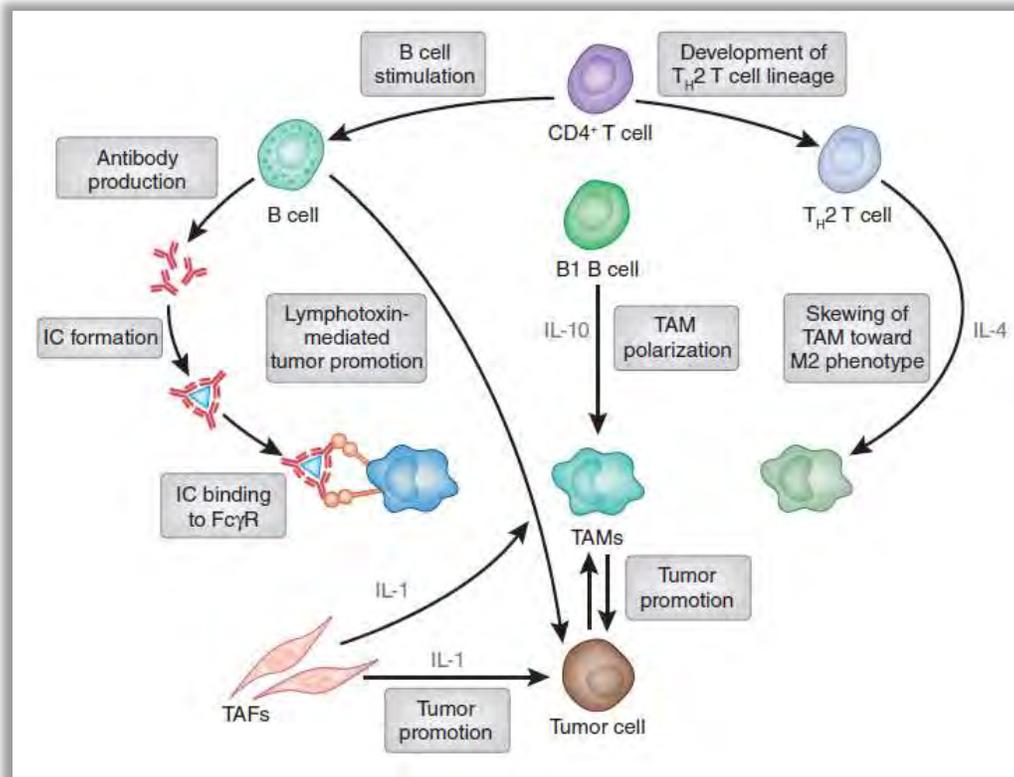


Figure 15: Orchestration des macrophages associés aux tumeurs (TAM) par les lymphocytes B.⁴⁹¹ Plusieurs voies orchestrent la fonction protumorale des cellules M2 dans les tumeurs. Les cellules B produisent des anticorps qui peuvent former des complexes immuns (ICs) reconnus par les récepteurs FcγR exprimés à la surface des TAM, orientant ainsi leur polarisation afin de favoriser le cancer. L'IL-4 dérivé des cellules Th2, les fibroblastes associés à la tumeur (TAF) et les cellules tumorales fournissent eux-mêmes des voies complémentaires qui peuvent polariser les macrophages vers un phénotype M2 protumoral.

1.2.4.8- Molécules immunosuppressives du microenvironnement tumoral

Les molécules sécrétées par les cellules cancéreuses et par diverses populations cellulaires immunosuppressives sont des éléments clés de l'immunosuppression de la réponse anti-tumorale. Ces molécules contribuent à la mise en place d'un environnement favorable au développement de la tumeur.

1.2.4.8.1- L'Interleukine 10 (IL-10)

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire qui peut être sécrétée par de nombreux types cellulaires dont les mastocytes, les lymphocytes B et les lymphocytes T CD4⁺ notamment les Treg dans le cancer.⁵⁷⁸ L'IL-10 supprime la production d'IFN-γ par les cellules NK, et de

cytokines pro-inflammatoires (IL-12, TNF- α) par les cellules dendritiques et les macrophages, ce qui limite la différenciation Th1 des cellules CD4⁺, et donc les réponses anti-tumorales liées à cette population. L'IL-10 induit également une diminution des molécules de costimulation CD80 et CD86 à la surface des cellules présentatrices d'antigènes et, donc, limite la capacité de ces cellules à activer les lymphocytes T. L'IL-10 exerce néanmoins un effet positif sur la différenciation et la migration des lymphocytes T cytotoxiques, et elle active les lymphocytes B en augmentant leur expression du CMH-II, induisant une plus grande production d'immunoglobulines IgA.⁵³⁹

1.2.4.8.2- L'IL-6 et l'IL-1 β

L'IL-6 et l'IL-1 β sont des cytokines pro-inflammatoires. L'IL-6 est produite par les monocytes, les macrophages et, parfois, par les cellules tumorales; elle joue un rôle essentiel dans le développement tumoral. L'IL-6 favorise la prolifération des cellules tumorales en stimulant la vascularisation de la tumeur.¹³⁶ Elle est aussi impliquée dans la résistance de certaines cellules cancéreuses à la chimiothérapie, via l'activation de STAT3, un intermédiaire de la voie de signalisation du récepteur de l'IL-6 qui induit l'augmentation de l'expression de différentes protéines anti-apoptotiques.⁶⁶² L'IL-6 agit également sur les lymphocytes Th17, en influençant l'expression à leur surface des ectonucléotidases CD39 et CD73, qui jouent un rôle essentiel dans l'immunosuppression.¹⁰⁴ Chez l'homme, il a été montré qu'elle pouvait bloquer la maturation des cellules dendritiques.⁵¹⁹ De plus, le niveau d'IL-6 présent dans le sérum de patients atteints de cancer colorectal a été associé à l'augmentation de la taille de la tumeur, la progression tumorale, ainsi qu'à une survie plus courte.⁵⁶⁸

L'IL-1 β a comme sources principales les macrophages et les cellules dendritiques. L'action de l'IL-1 β sur le système immunitaire dépend de sa concentration. La présence de grandes quantités d'IL-1 β , comme lors d'une inflammation aiguë, augmente la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8⁺ et favorise donc une immunité anti-tumorale.²³⁴ À l'inverse, une production d'IL-1 β modérée mais prolongée, par exemple lors d'une inflammation chronique, induit l'expansion des MDSC,⁷⁷ ainsi que le développement et la multiplication des lymphocytes Th17, favorisant ainsi le développement de populations immunosuppressives et, donc, une réponse immunitaire non optimale, maintenant la croissance tumorale.⁷²

1.2.4.8.3- Transforming Growth Factor- β (TGF- β)

Le TGF- β est une cytokine produite, en outre, par les Treg. C'est un puissant inhibiteur de la prolifération, qui joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie des cellules épithéliales, endothéliales et hématopoïétiques. Chez l'homme, sa présence à des stades précoces du développement de différents cancers contribue à l'élimination des cellules cancéreuses.¹³⁰

Cependant, une fois que les cellules cancéreuses échappent aux systèmes de contrôle de prolifération dépendants du TGF- β , cette cytokine facilite l'invasion de nouveaux tissus et la progression de la tumeur. La voie de signalisation du TGF- β s'avère donc une cible attrayante pour le développement de médicaments anti-cancéreux.⁸

▪ Signalisation du TGF- β

Trois isoformes de TGF- β hautement homologues existent chez l'homme: TGF- β 1, -2 et -3. Ils partagent les mêmes voies de signalisation, mais diffèrent aux niveaux de leurs taux d'expression, et leurs fonctions (comme le montrent les phénotypes de souris déficientes).⁸

Le clivage protéolytique du TGF- β latent libère le TGF- β actif et permet sa liaison à ses récepteurs sérine / thréonine kinase transmembranaires de types I et II. Cette liaison induit l'activation des domaines sérine / thréonine kinase intracellulaires facilitant la phosphorylation et l'activation ultérieure du récepteur de type I. L'activation du récepteur de type I conduit à la propagation de la signalisation par au moins deux voies indépendantes: la voie canonique SMAD-dépendante, et la voie non canonique SMAD-indépendante. (Figure 16)

Dans la voie canonique, l'activation du récepteur TGF- β RI conduit à la phosphorylation des R-SMAD (SMAD2 et SMAD3). Suite à leur phosphorylation, ces deux protéines ainsi que SMAD4 subissent une translocation vers le noyau, où elles interagissent avec d'autres facteurs de transcription pour réguler la transcription des gènes cibles.⁷⁶⁴ Les protéines R-SMAD participent également à la biogenèse et la régulation post-transcriptionnelle des microARN.¹³⁹

Dans la voie non-canonique, le complexe activé du récepteur au TGF- β transmet un signal par l'intermédiaire d'autres facteurs, tels que le TNF, TRAF4, TRAF6, MAPK p38, PI3K, AKT, ERK, JNK, NF- κ B et TAK1, la kinase activée par le TGF- β .⁸

Ainsi, les réponses cellulaires au TGF- β résultent de la combinaison dynamique de plusieurs cascades de signalisation canoniques et non canoniques ainsi que d'autres voies de signalisation, ce qui pourrait être la cause de la diversité des réponses liées au TGF- β .⁸

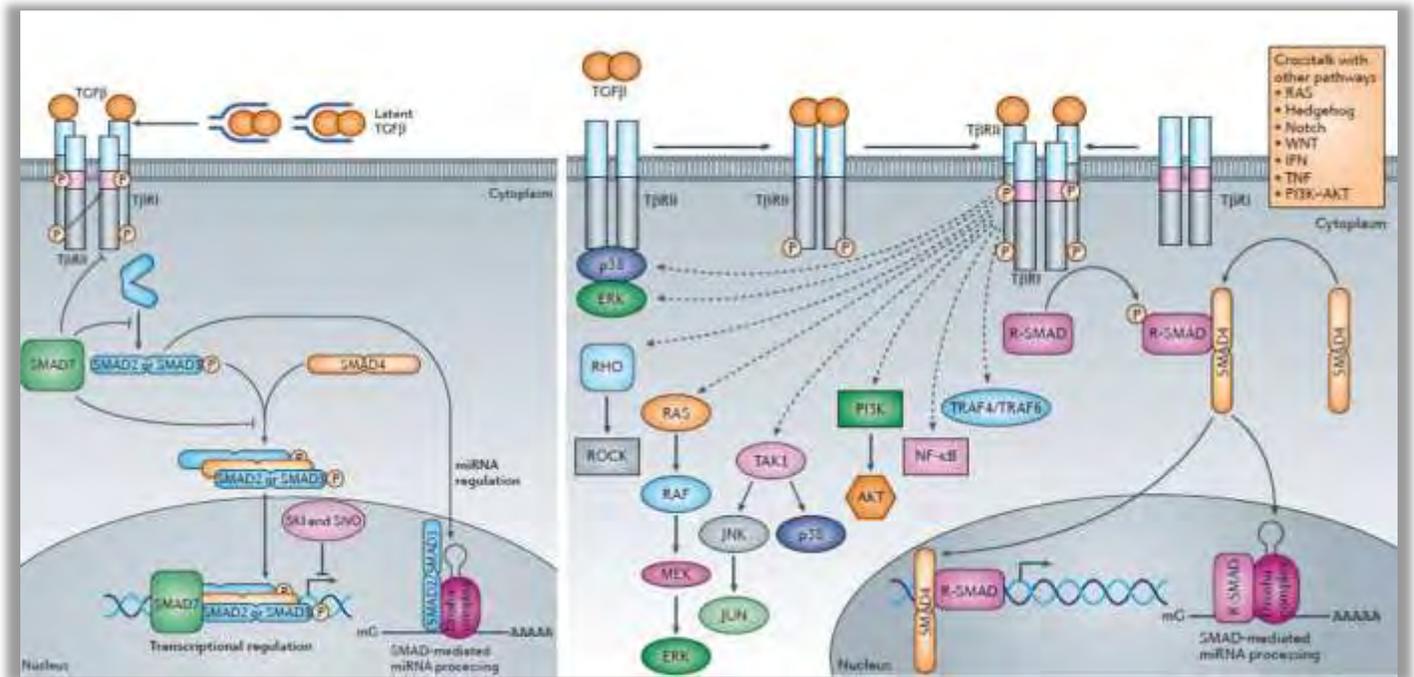


Figure 16: Schéma des voies canonique (gauche) et non canonique (droite) de la signalisation TGF- β .⁸

▪ **Immunosuppression, inflammation et cancer**

Le phénotype inflammatoire des souris TGF- β 1-KO démontre la fonction immunosuppressive de ce ligand.^{402, 772} Cette fonction immunosuppressive est exercée en limitant la croissance des cellules immunocompétentes ou bien en induisant leur polarisation vers des phénotypes tolérants. Le TGF- β exerce une activité de suppression de la croissance sur la plupart des cellules du système immunitaire en particulier les lymphocytes B et T, et ceci en inhibant la prolifération des cellules T et en induisant l'apoptose des cellules B.^{679, 716} (Figure 17)

Le TGF- β module l'orientation phénotypique des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en induisant leur différenciation en cellules Treg via la régulation positive mais indirecte de l'expression de FOXP3, et en inhibant leur différenciation en cellules Th1 et Th2.⁵⁰⁵

Au cours de la progression tumorale, l'excès de TGF- β abroge la surveillance immunitaire en atténuant les fonctions anti-tumorales des cellules T CD8⁺, T CD4⁺ et des cellules dendritiques. Ainsi, des souris transgéniques CD4- Δ TGF- β R2, qui sont déficientes pour la signalisation TGF- β dans les cellules CD4⁺, ont une réponse CTL plus spécifique envers les tumeurs en comparaison avec des souris sauvages.²⁵¹

Le TGF- β dérivé des tumeurs bloque également la différenciation des cellules dendritiques présentatrices de l'antigène et modifie l'expression de récepteurs aux chimiokines, ce qui bloque la migration de ces cellules et réduit la surveillance immunitaire.^{735, 918} En ce qui concerne les cellules du système immunitaire inné, le TGF- β inhibe directement la production d'IFN- γ médiée par les cellules NK. Il induit aussi la polarisation des macrophages et des neutrophiles d'un phénotype M1 anti-tumoral vers un phénotype M2 pro-tumoral.^{208, 495}

Outre sa fonction immunosuppressive prédominante, le TGF- β peut également exercer un rôle pro-inflammatoire par l'induction du phénotype Th17 en présence de l'IL-6.^{47, 489} La régulation du système immunitaire par le TGF- β est complexe et dépendante du contexte.

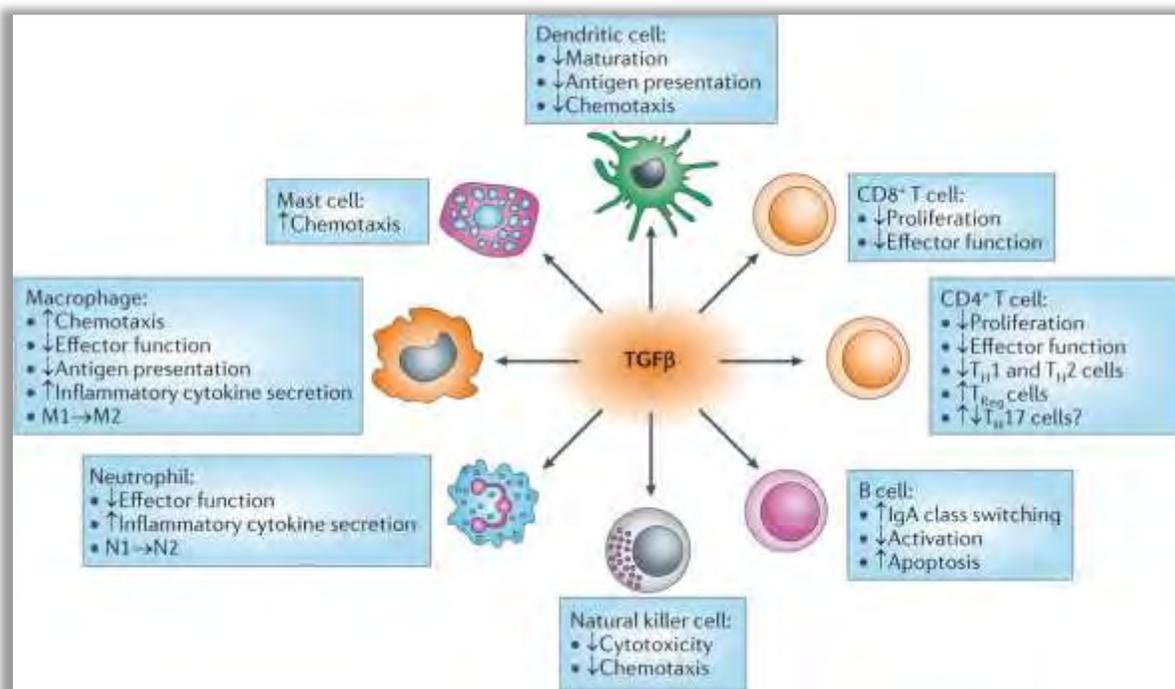


Figure 17: Effets du TGF- β sur les cellules du système immunitaire. ⁸

2- Thérapies ciblant le microenvironnement tumoral : efficacité et résistance

Le microenvironnement du mélanome joue un rôle majeur dans la mélanomagenèse, l'invasion tumorale, et la réponse aux thérapies conventionnelles. Le ciblage des composantes du stroma tumoral constitue une approche thérapeutique attrayante dans le traitement de ce cancer. (Tableau 3)

2.1- Ciblage de la matrice extracellulaire

Comme déjà énoncé, les MMP participent à la progression du mélanome. Certains inhibiteurs de ces protéases, marimastat (BB-2 516) et son analogue batimastat (BB-94), ont été développés au cours de la dernière décennie, mais n'ont pas répondu aux attentes cliniques lors de leur utilisation en monothérapie. L'échec clinique de ces inhibiteurs peut être partiellement due au fait que les MMP soient également requises pour la sécrétion de facteurs anti-angiogéniques tels que l'angiostatine et l'endostatine.⁵⁰² De plus, les inhibiteurs de MMP ont été testés chez des patients atteints de mélanome avancé, alors que les études précliniques avaient indiqué qu'ils n'étaient efficaces qu'au cours des stades précoces.^{604,871}

Outre les MMP, les cathepsines B, K, et L semblent être régulées à la hausse dans les cellules du mélanome et les cellules stromales voisines. Quelques essais précliniques ont montré que des inhibiteurs de ces protéases pourraient limiter le potentiel métastatique des cellules du mélanome.^{608, 675}

2.2- Ciblage de l'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse joue un rôle central dans la progression du mélanome; ainsi, les cellules endothéliales ainsi que les facteurs de croissance angiogéniques et leurs récepteurs constituent des cibles thérapeutiques. Ont été utilisé le bevacizumab, un anticorps monoclonal humanisé qui se lie au VEGF et inhibe sa fixation à son récepteur VEGFR ainsi que le BAY 43-9006, un inhibiteur de kinases multiples qui cible VEGFR. D'autres cibles angiogéniques telles que les protéases matricielles et des facteurs de croissance qui favorisent la vasculogenèse et la

prolifération de la cellule endothéliale, sont également en investigation.⁴⁸⁰ Cependant, certaines tumeurs développent une résistance aux agents anti-angiogéniques en exprimant des facteurs de sauvetage angiogénique⁸⁷¹.

Tableau 3: Essais cliniques des agents ciblant le microenvironnement du mélanome.⁸⁷¹

Target	Compound	Mechanism	Phase	Comments
Vasculature	AG-013736	VEGFR and PDGFR inhibitor	2	Starting dose 5 mg twice daily \pm 20% according to toxicity
	ABT-510	Synthetic analogue of thrombospondin-1/angiogenesis inhibitor	2	100 mg twice daily in patients with metastatic melanoma did not demonstrate definite clinical efficacy
	AZD2171	ATP-competitive inhibitor of VEGFR family	2	May also inhibit Kit and (less potently) PDGFR-A and PDGFR-B
	VEGF Trap (aflibercept)	Fusion protein that binds VEGF-A and placental growth factor	2	Effectively suppresses tumor growth and vascularization in vivo
	Bevacizumab	Anti-VEGF humanized monoclonal antibody binds to VEGF and inhibits VEGF receptor binding	1/2	Treatment with intravitreal bevacizumab for large uveal melanomas; efficacy of bevacizumab monotherapy being tested in trial in Norway
	Vorinostat (FR901228, romidepsin)	Histone deacetylase inhibitor	2	Proapoptotic in preclinical studies; blocks hypoxia-induced angiogenesis and depletes Hsp90-dependent oncoproteins
Integrins	Volociximab (M200)	$\alpha_v\beta_3$ integrin	2	Will also inhibit angiogenesis
	MEDI-522 (abergrin)	$\alpha_v\beta_3$ integrin	2	Humanized monoclonal antibody potent in vivo inhibitor of tumor growth and metastasis
	EMD 121974 (cilengitide)	$\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins	2	Cyclic Arg-Gly-Asp (RGD) peptide; inhibiting endothelial cell-cell interactions, endothelial cell-ECM interactions, and angiogenesis
	CNTO 95	α_5 integrins	1/2	Human monoclonal antibody; inhibits melanoma cell adhesion, migration, and invasion
Matrix	COL-3 (NSC-683551)	MMP-2 and MMP-9	1	Completed
	Marimastat	MMP	2	Limited activity in melanoma; trials in Canada and Europe
	GC1008	Human anti-TGF- β monoclonal antibody	1	
Other kinase inhibitors	RAF-265	MAPK inactivation/BRAF and VEGFR-2 inhibitor	1	Inhibits the RAF/MAPK pathway as well as VEGF and thus angiogenesis
	Sunitinib (SU11248)	Multikinase inhibitor including Kit, PDGFR, VEGFR	2	FDA approved for GIST and metastatic kidney cancer

ECM—extracellular matrix; FDA—US Food and Drug Administration; GIST—gastrointestinal stromal tumor; Hsp—heat shock protein; MAPK—mitogen-activated protein kinase; MMP—matrix metalloproteinase; PDGFR—platelet-derived growth factor receptor; TGF—transforming growth factor; VEGFR—vascular endothelial growth factor receptor.
(All data from <http://www.clinicaltrials.gov>.)

2.3- L'immunothérapie

Le mélanome est une tumeur largement investiguée comme cible pour l'immunothérapie en raison de son potentiel immunogène élevé et de l'infiltration des lymphocytes dirigés contre ses antigènes spécifiques.³⁶⁷ Toutefois, la tumeur et son environnement sont capables d'induire l'anergie ou l'épuisement des lymphocytes infiltrant qui ne sont ainsi plus capables de réagir à un stimulus antigénique ou simplement activateur. L'expression de récepteurs inhibiteurs comme CTLA-4, et PD-1 par les lymphocytes cytotoxiques et/ou de ligands ou facteurs solubles par les cellules tumorales ou du microenvironnement ainsi que la présence de cellules immunosuppressives ou de cellules présentatrices d'antigènes immatures limitent l'induction d'une réponse anti-tumorale efficace.⁸¹⁰ (Figure 18)

La compréhension de ces mécanismes est nécessaire pour contourner l'échappement immunitaire et développer des stratégies thérapeutiques efficaces en clinique. Dans ce contexte une nouvelle génération d'anticorps monoclonaux est en pleine ascension, les anticorps ciblant les lymphocytes T dans l'intention de stimuler ou réactiver les réponses T spécifiques. Parmi ces anticorps, on trouve les anti-TNF α , anti-IL-10 ou anti-TGF- β , des anticorps agonistes stimulant les récepteurs activateurs et les anticorps antagonistes bloquant les voies inhibitrices (anti-CTLA-4 et anti-PD-1/PD-L1).^{157, 516, 750}

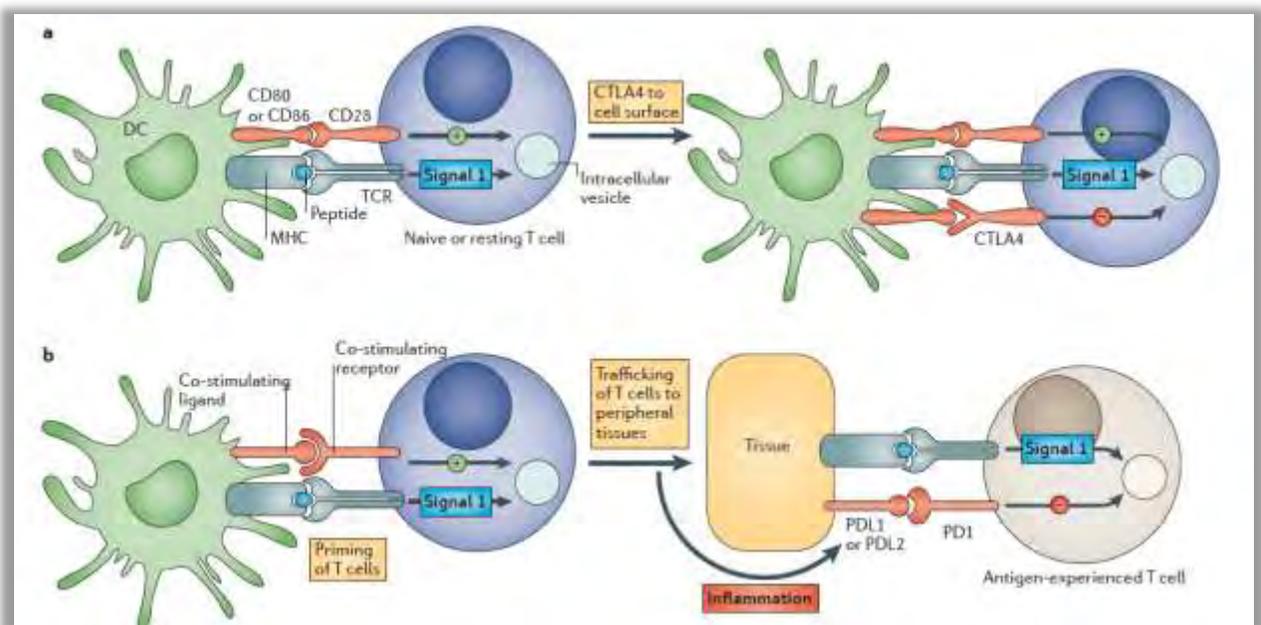


Figure 18: Régulation de la réponse immunitaire par les points de contrôle immunitaire. ⁶¹²

2.3.1- Les anti-CTLA-4

CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) est le premier point de contrôle immunitaire ciblé cliniquement pour le traitement du mélanome. Exprimé uniquement par les lymphocytes T, CTLA-4 régule l'amplitude de l'activation de ces cellules en neutralisant l'action de la molécule costimulatrice, CD28.^{438, 717, 748}

Une fois la reconnaissance d'un antigène par les récepteurs des lymphocytes T (TCR), CD28 amplifie fortement la signalisation de ces derniers pour activer les cellules T. CD28 et CTLA-4 partagent des ligands identiques: CD80 (ou B7-1) et CD86 (ou B7-2).^{30, 203, 284} L'expression de CTLA-4 à la surface des cellules T atténue leur activation par compétition avec CD28 pour la liaison de CD80 et CD86, ainsi que par la production des signaux inhibiteurs.^{458, 698, 743} En effet, certaines études suggèrent que l'activation par CTLA-4 des protéine phosphatases, SHP2 et PP2A, joue un rôle important dans la lutte contre les signaux de kinases qui sont induits par CD28.⁷¹⁷

Le rôle physiologique de CTLA-4 semble être exercé principalement sur les populations de lymphocytes T CD4⁺, notamment il régule positivement l'activité des cellules Treg aux dépens de celle des cellules T auxiliaires (Th).^{630, 898} Une autoimmunité et une hyperactivation immunitaire systémique létale sont observées chez les souris déficientes pour CTLA-4.^{842, 882} Dans ce contexte, a été développé en 1996 un modèle préclinique démontrant que l'inhibition partielle de CTLA-4 par des anticorps pouvait renforcer la réponse antitumorale endogène et aboutir à une régression tumorale sans toxicité immunitaire. Cependant, cette réponse n'avait été observée que pour des tumeurs peu immunogènes et en combinaison avec une approche vaccinale utilisant le GM-CSF.^{429, 862}

Ces résultats précliniques ont encouragé le passage aux essais cliniques de l'anti-CTLA-4 chez l'homme. Les premiers essais ont débuté dans les années 2000 avec deux anticorps monoclonaux humanisés dirigés contre CTLA-4 : l'ipilimumab (de type IgG1) (Yervoy®, BMS) et le trémélimumab (IgG2) (CP-675,206, ticilimumab, Pfizer). Le premier essai de phase III a été réalisé avec le trémélimumab comparé à la dacarbazine, dans les mélanomes avancés. Cet essai a dû être interrompu devant l'absence d'amélioration par rapport au traitement standard.⁶⁹² En revanche, les essais cliniques de l'ipilimumab ont montré un bénéfice en survie. (Tableau 4) Par

la suite, l'ipilimumab a été approuvé par la FDA et l'EMA en 2011 pour le traitement du mélanome métastatique.

2.3.2- Les anti-PD-1/PD-L1

PD-1 (Programmed cell death protein-1) est un récepteur de rétrocontrôle immunitaire impliqué dans la modulation de l'activité des lymphocytes T dans les tissus périphériques par l'intermédiaire de l'interaction avec ses ligands, PD-L1 (B7-H1) et PD-L2 (B7-DC). Ce récepteur empêche la surstimulation des réponses immunes et contribue au maintien de la tolérance immunitaire aux antigènes du soi.^{204, 371}

Lors de la reconnaissance de l'antigène, les cellules T activées expriment à leur surface PD-1 et produisent les interférons qui stimulent l'expression de PD-L1 dans de nombreux tissus, y compris le cancer et particulièrement le mélanome. PD-L2 est exprimé par les cellules dendritiques, les macrophages, les mastocytes et les lymphocytes B.^{540, 612, 846, 946} La liaison de PD-1 à ses ligands limite l'activité effectrice des cellules T, et par conséquent elle régule la réponse immunitaire et prévient l'auto-immunité⁸⁴⁶. PD-1 est induit non seulement sur les lymphocytes T effecteurs, mais également sur les Tregs²⁰², les lymphocytes B activés et les cellules NK.⁸³⁷

Plusieurs anticorps qui ciblent l'axe PD-1/PD-L1 ont été mis au point pour différentes tumeurs. Les anti-PD-1 bloquent sa liaison à la fois à PD-L1 et PD-L2, tandis que les anticorps anti-PD-L1 bloquent l'interaction PD-1/PD-L1 et potentiellement l'interaction PD-1/CD80.⁵⁴⁰

En ce qui concerne les anti-PD-1, plusieurs anticorps monoclonaux ont été développés: le nivolumab (IgG4 humain), le pembrolizumab (IgG4 humanisé), et le pidilizumab (IgG1 humanisé). Les anti-PD-L1 qui sont en développement clinique comprennent: MPDL3280A, MEDI4736, et MSB0010718C. Ces anticorps appartiennent à l'isotype IgG1.²⁹⁵

Le nivolumab a été récemment comparé avec la dacarbazine dans une étude de phase III chez les patients atteints de mélanome non muté pour BRAF et n'ayant reçu aucun traitement. Le taux de survie à 1 an était de 73% pour le nivolumab vs 42% pour la dacarbazine. Les événements indésirables ont été plus fréquents dans le groupe traité par la dacarbazine.⁵⁴⁰

Dans un autre essai de phase III, le nivolumab a été comparé à la chimiothérapie chez les patients ayant subi une progression tumorale sous ipilimumab. Le taux de réponse global en présence du nivolumab a augmenté de 11% à 32%, avec diminution des événements indésirables. Le nivolumab a été approuvé en Décembre 2014 pour les patients atteints de mélanome à un stade avancé après progression de la maladie suite à un traitement thérapeutique.⁸⁸⁵

Pour le lambrolizumab, l'essai clinique de phase II comparant deux schémas posologiques chez des patients atteints de mélanome avancé et réfractaires à l'ipilimumab, a montré que le lambrolizumab a amélioré la survie sans progression et les réponses objectives durables par rapport à la chimiothérapie. Le lambrolizumab a reçu l'approbation de la FDA en Septembre 2014 pour les patients atteints de mélanome traités préalablement par l'ipilimumab.^{693, 702}

Pour les anti-PD-L1, les cohortes réalisées sur des patients atteints de mélanome métastatique traités avec MPDL3280A ont abouti à un taux de réponse global de 26% et une survie sans progression sur 24 semaines de 35%.²⁷⁵ La combinaison du MPDL3280A avec le vémurafénib est actuellement en étude chez les patients atteints de mélanome avancé et mutés pour BRAF. L'anticorps MEDI4736 est également en cours d'étude en combinaison avec le dabrafénib et le tramétinib, deux inhibiteurs de la voie BRAF, chez des sujets atteints de mélanome métastatique portant la mutation BRAF.⁵⁴⁰

Le ciblage de l'activation des cellules T à différents stades de la réponse immunitaire pourrait conduire à une efficacité accrue dans le contexte clinique, ce qui pourrait retarder la résistance aux agents conventionnels. La combinaison des anticorps ciblant PD-1 et CTLA-4 dans des modèles précliniques a amélioré l'activité antitumorale par rapport à la monothérapie.¹³² De même, les études cliniques ont montré que le traitement combinant l'ipilimumab et le nivolumab chez les patients atteints de mélanome avancé, a amélioré le taux de réponse jusqu'à 40%. Cependant 53% des patients ayant reçu le traitement combiné ont subi plus d'effets indésirables par rapport à la monothérapie.⁹⁰⁰

D'autres récepteurs inhibiteurs tels que LAG3, CD244, BTLA et TIM3 ont été associés à l'inhibition de l'activité des lymphocytes et l'induction de leur anergie. Le ciblage de ces récepteurs par des anticorps, en monothérapie ou en combinaison avec d'autres agents bloquants, montre une augmentation de l'immunité anti-tumorale dans des modèles animaux du cancer.

Bien que les anticorps bloquants humains spécifiques pour un certain nombre de ces «checkpoints» immunitaires de seconde génération soient en cours de développement, aucun n'est pour l'instant utilisé en clinique.⁶¹²

Tableau 4: Résultats des essais cliniques des immunothérapies dans le mélanome⁵¹⁵

Agents	Indication	n	Taux de réponses	Survie	Refs
Ipilimumab et/ou nivolumab	Mélanome non traité de stade avancé	945	-Nivolumab: 44% -Ipilimumab + nivolumab: 58% -Ipilimumab: 19%		421
Ipilimumab et nivolumab (combinaison simultanée ou séquentielle avec augmentation de dose)	Mélanome de stade avancé	53	42%	1 an: 85% 2 ans: 79%	822
Ipilimumab +/- nivolumab	Mélanome non traité de stade avancé	142	-Ipilimumab + nivolumab: 61% -Ipilimumab: 11%	Survie moyenne sans progression Ipilimumab: 4.4 mois	653
Ipilimumab et bevacizumab (combinaison simultanée ou séquentielle avec augmentation de dose)	Mélanome de stade avancé	46	19.6%	Survie globale moyenne: 25.1 mois	303
Ipilimumab et/ou vaccin GP100	Mélanome de stade avancé prétraité	676	-Ipilimumab: 10.9% -Ipilimumab + vaccin: 5.7% -Vaccin: 1.5%	Survie globale moyenne: Ipilimumab: 10.1 mois Ipilimumab + vaccin: 10 mois Vaccin: 6.4 mois	304
Ipilimumab +/- dacarbazine	Mélanome non traité de stade avancé	502	-Ipilimumab + dacarbazine: 15.2% -Dacarbazine: 10.3%	Survie globale moyenne: -Ipilimumab + dacarbazine: 11.2 mois -Dacarbazine: 9.1 mois	703

2.3.3- Les cytokines

L'interleukine-2 (IL-2), une protéine produite principalement par les lymphocytes T CD4⁺, active et induit la prolifération des cellules NK, et T CD4⁺ et CD8⁺. Vu la durabilité de la réponse induite par l'IL-2, cette cytokine a été approuvée par la FDA pour le traitement du mélanome métastatique. Cependant, le taux des réponses cliniques objectives à la monothérapie d'IL-2 n'est que de 15%, avec de nombreux effets secondaires tels que l'œdème pulmonaire, l'hypotension et la fièvre.⁷⁷⁰

Dans un essai clinique randomisé chez des patients atteints de mélanome métastatique, la combinaison de l'IL-2 avec le vaccin peptidique gp100 a doublé les réponses cliniques et a augmenté la survie sans progression par rapport à l'utilisation unique d'IL-2.⁷⁴⁹

Actuellement, une nouvelle stratégie proposant l'utilisation concomitante d'IL-2 et du vaccin de l'antigène MAGE contenant un adjuvant est en cours d'investigation. Un autre essai intéressant combinant de fortes doses d'IL-2 à l'ipilimumab chez des patients atteints de mélanome métastatique a montré un taux de réponse global de 25% maintenu au-delà de 6 ans, avec un taux de réponse complète de 17%. Ceci suggère que la combinaison de cytokines stimulatrices avec des inhibiteurs des points de contrôle immuns pourrait constituer une stratégie thérapeutique prometteuse.⁶⁶¹

L'interféron-alpha (IFN- α) est approuvé par la FDA pour le traitement adjuvant du mélanome de stade III. L'IFN- α a été montré pour augmenter la survie sans récurrence mais pas la survie globale dans la plupart des études. Les données suggèrent que les patients atteints de lésions primaires et microscopiques ulcérées doivent bénéficier d'IFN- α en comparaison avec les patients présentant un mélanome nodal palpable.⁷⁷⁰ Les effets secondaires associés à ce traitement sont une hépatite immunitaire, de la fièvre, des frissons et de la fatigue.

D'autres cytokines comme l'IL-21, qui a produit un taux de réponse objective de 22,5%, et l'IL-12 qui a montré des réponses positives^{641, 770}, sont actuellement en cours d'étude pour le traitement du mélanome métastatique.

2.3.4- Transfert adoptif de lymphocytes T

Cette stratégie thérapeutique implique la sélection de lymphocytes autologues ayant une activité antitumorale, leur expansion / activation *ex vivo*, et leur réinjection chez le patient afin de réduire au minimum l'immunosuppression endogène.^{221, 341} (Figure 19) Ce traitement a induit la régression tumorale chez environ 50% des patients atteints de mélanome métastatique.⁷¹¹

Malgré l'efficacité thérapeutique du transfert adoptif dans le mélanome, certains défis empêchent son approbation large par la FDA, notamment la méthodologie complexe de fabrication de grands nombres de cellules T, et la toxicité liée à l'utilisation de fortes doses d'IL-2 dans ce protocole.⁷⁷⁰

Les rechutes fréquemment observées après l'immunothérapie par transfert adoptif sont dues à la perte réversible d'antigènes mélanocytaires médiée par le TNF- α ⁴¹⁴; et au rôle immunosuppresseur des Tregs.³⁸⁷ La possibilité d'utiliser le marqueur immunostimulateur CD137 pour la sélection des lymphocytes T réactifs contre les cellules tumorales a été explorée récemment avec succès.⁹²⁶

La défaillance des cellules CD8⁺ transférées à persister chez les patients pourrait être une cause majeure de l'efficacité limitée de cette approche de traitement. Dans certains essais ce problème a été traité par l'administration de l'IL-2 après la perfusion, ou la lymphodéplétion avant la perfusion. Une autre approche a été également testée, elle consiste à stimuler des cellules CD8⁺ *in vitro* avec des APC présentant l'antigène MART-1 en présence d'IL-2 et d'IL-15. Ces lymphocytes ont montré un phénotype mémoire, et ont été dirigés avec succès aux sites tumoraux, produisant ainsi une réponse complète chez l'un des neuf patients, ainsi que des réponses partielles chez plusieurs patients.⁸⁴

Une dernière approche de transfert adoptif de cellules T en cours d'investigation est de créer des populations de cellules T réactives aux tumeurs à partir de la transduction par rétrovirus de récepteurs chimériques d'antigènes (CAR) dirigés contre des antigènes associés aux tumeurs. Ceci évite le besoin de présentation des antigènes par les CMH des APC pour activer les cellules T. Dans le mélanome, les lymphocytes T redirigés pour reconnaître MART-1 ont montré des réponses cliniquement significatives.^{372, 803}

Des résultats récents indiquent que les cellules T CD4⁺ pourraient également contribuer à la réussite du transfert adoptif en induisant la sénescence tumorale liée à la production de niveaux élevés d'IFN- γ et de TNF- α .⁶⁶

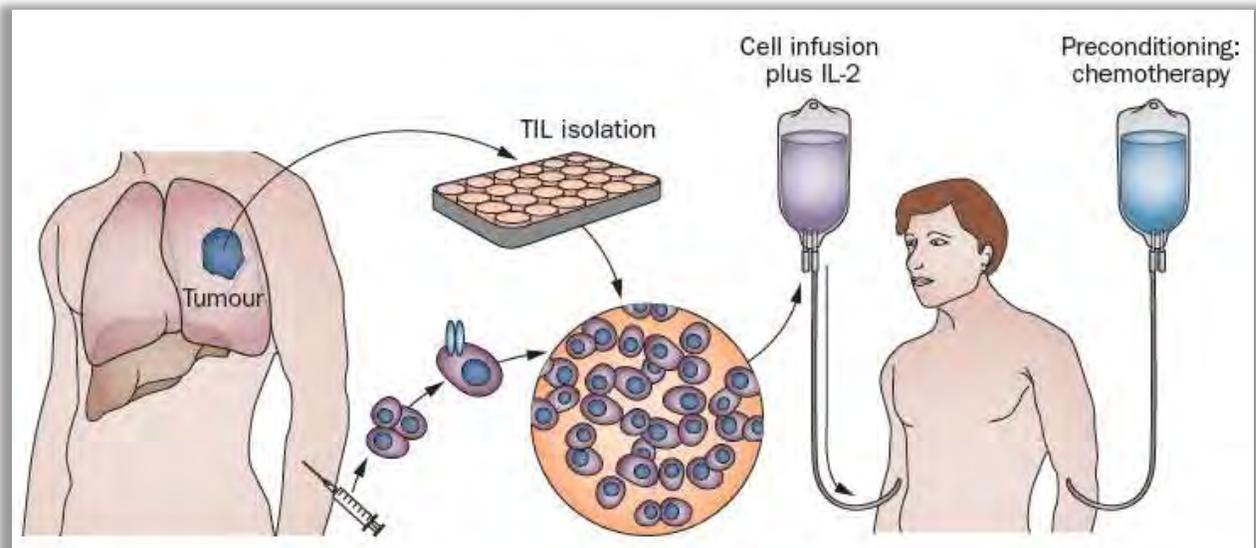


Figure 19: Immunothérapie par transfert adoptif de cellules.⁷⁰⁹

2.3.5- Transfert adoptif de cellules NK

Les cellules NK sont une partie essentielle de l'immunité innée et ont attiré l'attention dans le cadre des immunothérapies du mélanome. Les cellules NK, en principe, sont capables de reconnaître et détruire les cellules infectées par un virus ou les cellules malignes sans nécessité d'une stimulation antigénique préalable. Cependant, leur activité dépend d'une balance entre des facteurs stimulateurs ou inhibiteurs comme déjà énoncé. Les récepteurs inhibiteurs de cellules NK, KIR, ont été ciblés au cours d'un essai clinique avec l'anticorps antagoniste BMS-986015, conçu pour bloquer l'inhibition par KIR de la cytolysse des cellules tumorales.⁷⁷⁰

Les cellules NK obtenues à partir des PBMC ont été activées *in vitro* pour subir le transfert adoptif.⁷¹⁰ Ces essais de transfert adoptif de cellules NK autologues avec ou sans lymphodéplétion préparative n'ont attribué aucun avantage à cette technique.⁶¹⁵ De nouvelles stratégies pourraient inclure la combinaison du transfert de cellules NK avec des anticorps immunomodulateurs, ou même le transfert de cellules NK allogéniques activées.⁴⁵

2.3.6- Immunothérapie à base de cellules dendritiques

Cette technique consiste à incuber les DC avec les antigènes tumoraux et un adjuvant *ex vivo*. Ce processus induit la maturation des DC, qui consiste à traiter les antigènes et les présenter aux cellules T CD4⁺ et CD8⁺ par molécules de CMH. Les DC peuvent également stimuler la réponse immunitaire innée (cellules NK et phagocytes) ainsi que la réponse immunosuppressive des cellules T régulatrices suivant les facteurs présents dans le microenvironnement tumoral.⁷⁷⁰

Des essais cliniques ont exploré les différentes méthodes de génération des DC chez des patients atteints de mélanome métastatique. Dans un essai clinique réalisé en 1998, les patients ont été vaccinés par des DC dérivées de monocytes incubés avec un lysat tumoral ou un mélange de peptides liés à la tumeur, et stimulées avec le GM-CSF et l'IL-4. Cinq de 16 patients ont montré des réponses objectives.⁵⁶⁶ L'activation des monocytes par un peptide tumoral unique MAGE-3A1, a abouti à une expansion clonale de cellules T CD8⁺ dirigées contre MAGE-3A1 chez 8 de 11 patients de mélanome métastatique.⁸⁴⁰

Dans des approches différentes, les DC immatures ont été générées à partir des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ ou à partir des cellules de Langerhans, par stimulation avec un cocktail de cytokines prédéfinies, et elles ont été incubées *in vitro* avec un pool de peptides dérivés d'antigènes de mélanome. Ces approches aboutissent à des réponses immunitaires durables.^{476, 707}

La stimulation des DC pourrait être effectuée non seulement en les exposant à des antigènes tumoraux, mais aussi en les transfectant par des ARNm codant pour ces antigènes.⁵²⁹ Cette méthode rallonge la durée d'exposition et induit de fortes réponses immunitaires significatives traduites par un large répertoire de lymphocytes T spécifiques producteurs d'IFN- γ .¹

La réussite de la vaccination par les DC dépend également de leur capacité à stimuler les cellules T CD8⁺ via la sécrétion d'IL-12 p70. Ceci dépend, à son tour, de la stimulation des DC par deux signaux: CD40 ou TLR et INF- γ . La maturation *in vitro* de PBMC et leur stimulation à la fois par CD40L et INF- γ augmente les niveaux d'IL-12 produits par les DC, et améliore la réponse clinique.⁹⁵ Tous ces résultats cliniques montrent l'intérêt de la vaccination par les DC. La combinaison de cette technique avec des anticorps immunomodulateurs pourraient aboutir à des résultats prometteurs.⁶⁹⁴

2.3.7- Ciblage des macrophages associés aux tumeurs

Plusieurs agents qui ciblent le recrutement des macrophages dans les tissus tumoraux et / ou inhibent la différenciation des macrophages vers le phénotype M2 pro-tumoral sont actuellement en cours d'investigation. De façon intéressante, l'utilisation de la trabectédine qui tue les monocytes et /ou les macrophages, a montré une efficacité vis-à-vis des tumeurs murines.²³²

Le ciblage du CD204, un récepteur éboueur de classe A fortement exprimé sur les TAM, par un anti-CD204 a permis d'éliminer les TAM et d'inhiber la progression du cancer de l'ovaire chez la souris.³³

De même, le ciblage du récepteur du folate (FR β), préférentiellement exprimé sur les TAM, par une immunotoxine a abouti à la déplétion des TAM et la suppression de la croissance tumorale dans un modèle de gliome de rat.^{557, 663}

De plus, un anticorps dirigé contre TIM-3 qui joue un rôle important dans l'activation de TAM, est capable de supprimer les effets tumorigènes dans un modèle de cancer du rein.³⁹⁰

Une étude récente a montré que le CSF-1, requis pour la différenciation des macrophages, joue également un rôle important dans la formation des réseaux de vaisseaux sanguins à haute densité (HEV) dans un modèle de tumeur murine.⁴⁰¹ Certains inhibiteurs du récepteur CSF-1R ont été développés et semblent réduire de manière significative la progression tumorale par l'inhibition de la différenciation des macrophages vers le phénotype M2 pro-angiogénique.^{400, 668} Dans le glioblastome, l'inhibition du CSF-1R se traduit par la réduction importante du volume tumoral et la survie à long terme des souris. Cette inhibition s'est accompagnée d'une repolarisation des macrophages vers un phénotype anti-tumoral.⁶⁷² Des résultats similaires ont été observés dans des modèles de cancer du sein et du col utérin.⁸¹¹ Les inhibiteurs du CSF-1R ont également amélioré l'efficacité de la chimiothérapie et de la radiothérapie par la stimulation des réponses immunitaires anti-tumorales.^{530, 765} Le ciblage du CSF-1R par un anticorps neutralisant, a abouti à l'augmentation du rapport des cellules T CD8⁺ / CD4⁺.⁶⁹⁵

L'ensemble de ces données démontre l'importance du ciblage des TAM dans les thérapies anti-tumorales, que ce soit en termes de déplétion ou de redifférenciation.

2.3.8- Ciblage de TGF- β

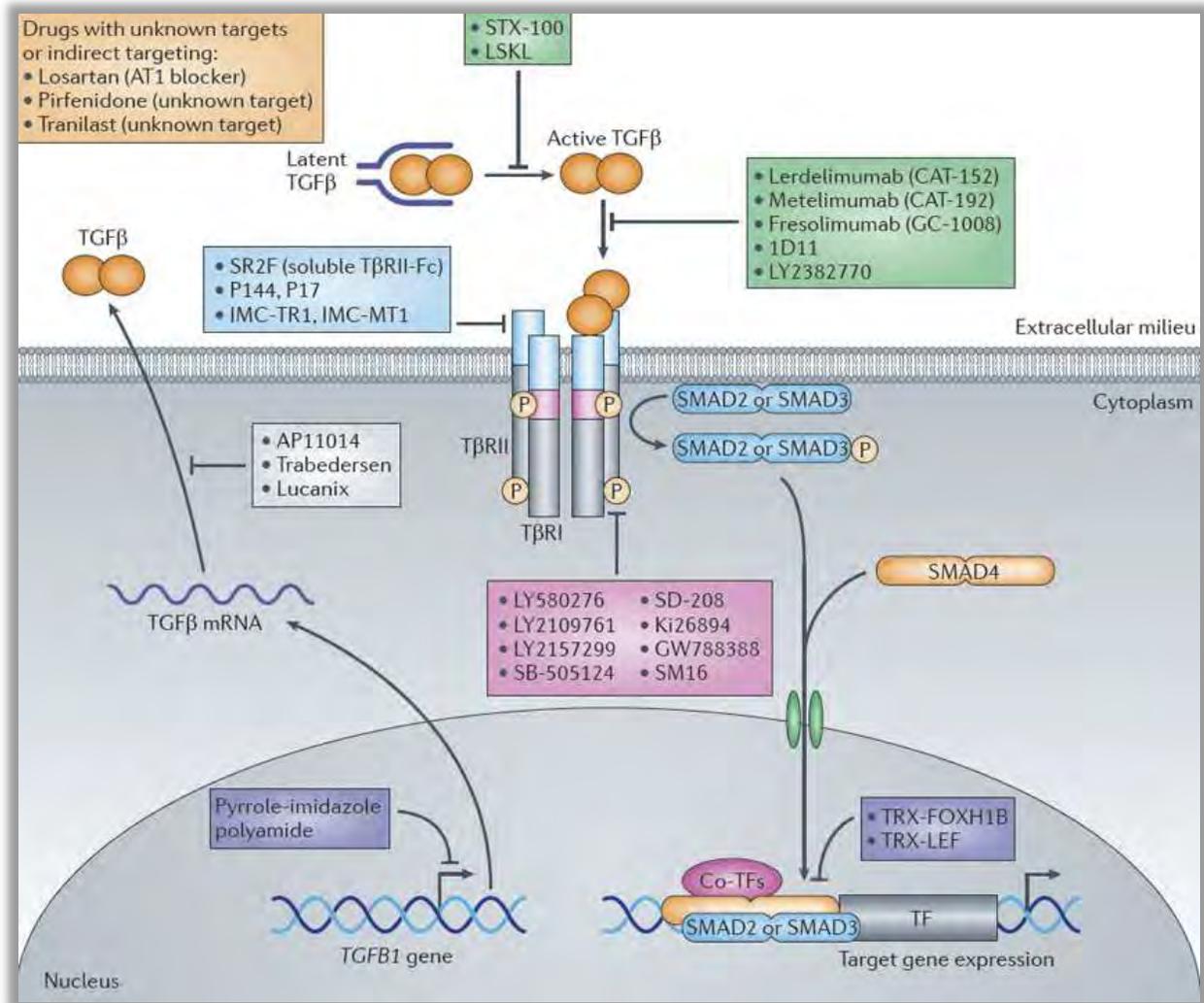


Figure 20: Représentation schématique des approches thérapeutiques bloquant la signalisation TGF- β .⁸

Plusieurs stratégies thérapeutiques ont été conçues pour cibler la voie de signalisation TGF- β . (Figure 20) Ainsi, la signalisation TGF- β pourrait être inhibée par : 1- la séquestration de TGF- β à l'aide de récepteurs solubles dérivés des ectodomains des récepteurs T β RII ou T β RIII, 2- l'utilisation d'anticorps ou de peptides inhibiteurs neutralisant le TGF- β , ou 3- des inhibiteurs des kinases du T β RI ou T β RII. De plus, la traduction de l'ARNm du TGF- β peut être bloquée en ciblant ce dernier avec des oligonucléotides antisens, empêchant ainsi la production de la protéine. D'autres approches ciblant le TGF- β reposent sur le blocage du passage de ce ligand de

la forme latente jusqu'à la forme active. Trois molécules qui affectent la signalisation du TGF- β indirectement (losartan) ou via une cible non encore identifiée (tranilast et pifénidone) ont été également décrites.⁸

Toutes ces approches réduisent l'initiation des signaux en aval des récepteurs au TGF- β , tels que la phosphorylation des protéines R- SMAD, et la régulation transcriptionnelle des gènes cibles. Ces approches ont été testées dans des essais précliniques et ont montré une efficacité dans l'inhibition de la progression de différentes maladies notamment le cancer. (Tableau 5)

Tableau 5: Récapitulatif des différentes molécules inhibitrices de TGF- β en développement préclinique.⁸

Drugs; company	Type	Targets	Disease applications	Stage	Summary of results	Refs
AP11014; Antisense Pharma	Antisense oligo	TGF β 1 ligand	Prostate cancer, NSCLC, colorectal cancer	Preclinical	AP11014 significantly reduced TGF β 1 secretion by 43–100% in different NSCLC, colon and prostate cancer cell lines.	217
P17; Digna Biotech	Peptide	Peptide derived from Phage Display technology that targets TGF β 1 binding to receptor	Liver and pulmonary fibrosis, metastatic lung cancer, angiogenesis, melanoma, immunosuppression, wet AMD	Preclinical	Preclinical efficacy in peritoneal fibrosis associated with peritoneal dialysis, lung fibrosis, corneal haze, and retinal AMD	76
ESKL (academic only)	Peptide	Thrombospondin		Preclinical	Preclinical efficacy in reducing renal injury and proteinuria in a murine model of diabetic nephropathy	97
TD11; R6O Systems	Mouse antibody	Mouse TGF β 1, TGF β 2 and TGF β 3 ligands	Breast cancer	Preclinical	Safe and efficacious in tumour metastasis in mice	79,80, 218
SR2F (academic only)	Ligand trap	TGF β 1, TGF β 3	Breast cancer	Preclinical	Very safe after lifetime exposure in mice; not progressing to clinical trial	125
Soluble T β R2-Fc; Genzyme	Ligand trap	TGF β 1, TGF β 3	Breast cancer	Preclinical	Safe and efficacious in suppressing metastasis in preclinical model of breast carcinoma; not progressing to clinical trial	96
LY580776, LY550410, LY364947, LY2109761*; Eli Lilly	Small molecule	T β R1 kinase	Cancer	Preclinical	LY2109761 is safe in long-term dosing of tumour-bearing mice, and efficacious in reducing metastasis and TICs in mouse cancer models	80,156, 219–222
SB-505174, SB-431542; GlaxoSmithKline	Small molecule	T β R1 kinase		Preclinical	Extensively used in vitro; pharmacokinetically unstable in vivo	223–225
SD208, SD093; Scios	Small molecule	T β R1 kinase	Cancer	Preclinical	Efficacious in suppressing tumour metastasis in rodent models; programme discontinued after merger with Johnson & Johnson	146, 226,227
KI26894; Kirin Pharmaceuticals	Small molecule	T β R1 kinase	Breast cancer	Preclinical	Not progressing to clinical trial	148,150
SM16; Biogen Idec	Small molecule	T β R1 kinase	Mesothelioma	Preclinical	Not progressing to clinical trial	10,155, 228,229
GW788388; GlaxoSmithKline	Small molecule	T β R1 kinase	Fibrosis	Preclinical	Not progressing to clinical trial	230–232
GB1201, GB1203 (academic)	Pyrazole-imidazole polyamide	TGF β 1 gene promoter	Cutaneous and corneal scarring, arterial restenosis, kidney fibrosis	Preclinical	Preclinical efficacy in inhibition of TGF β 1 gene expression, which reduced corneal scarring and carotid artery restenosis	50, 102,103

*Contrary to earlier reports¹⁶, LY573638 is not a TGF β -specific inhibitor. NSCLC, non-small-cell lung cancer; oligo, oligonucleotide; T β R, TGF β receptor; TGF β , transforming growth factor β ; TICs, tumour-initiating cells.

III. Les Sphingolipides

1- Généralités

Les sphingolipides (SLs), comme les glycolipides et les stérols, sont des éléments lipidiques de structure de la membrane plasmique des cellules eucaryotes. Ils jouent un rôle important dans la régulation de la perméabilité et la signalisation cellulaire.⁴⁰⁸ La nature énigmatique des sphingolipides, nommés ainsi en référence au sphinx de la mythologie grecque, remonte non seulement à leur structure et métabolisme complexes, mais aussi aux fonctions biologiques qu'ils remplissent.⁷²¹

Les SLs sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique à partir de précurseurs non sphingolipidiques. Ils sont caractérisés par une structure de base à 18 atomes de carbone et une fonction amino-alcool, appelée la base sphingoïde. La base sphingoïde des SLs peut être la sphinganine ou la sphingosine qui contient une double liaison trans 4-5, essentielle pour l'activité biologique des SLs qui sont à base de sphingosine. Un certain nombre d'autres bases sphingoïdes de longue chaîne a été décrit: la phytosphingosine (4-hydroxysphinganine) comprend un groupe hydroxyle en C-4, la méthylsphingosine contient un groupe méthyle en C-15, et d'autres bases sphingoïdes contenant 20 atomes de carbone ont été détectées à des niveaux élevés dans les gangliosides cérébraux. Dans des cas rares, des bases sphingoïdes contenant 14 atomes de carbone ont été décrits.⁵¹⁷

Des acides gras sont fixés par N-acylation à ces bases sphingoïdes pour former les SLs. Ces acides gras peuvent être saturés de longueur de chaîne et degré d'hydroxylation variables ou monoinsaturés à très longues chaînes.⁴⁰⁸

La biosynthèse et le catabolisme des SLs forment un réseau très complexe d'étapes métaboliques où le céramide occupe la position centrale.^{13, 548} La synthèse *de novo* du céramide commence par la condensation de la sérine et du palmitoyl coenzyme A (CoA), une réaction contrôlée par la sérine palmitoyl transférase (SPT), elle-même régulée négativement par la protéine ORM1-like 3 (ORMDL3). Cette condensation est suivie par une série de réactions conduisant à la formation de céramide.⁴⁷⁵ (Figure 21)

Par la fixation de différents groupes sur le carbone C-1, le céramide donne plusieurs SLs complexes. Par exemple, la fixation de la phosphorylcholine forme la sphingomyéline (SM), et la fixation du glucose ou du galactose est la première étape dans la formation des glycosphingolipides (GSLs). D'autres sucres plus complexes tels que la N-acétylglucosamine, la N-acétylgalactosamine et l'acide sialique ont été décrits dans les GSLs ce qui augmente la diversité structurale et la complexité de cette classe de SLs.^{245, 388}

Le céramide peut également être formé à partir de l'hydrolyse de la SM ou du glucosylcéramide, catalysée respectivement par des sphingomyélinases (SMases) ou des glucosylcéramidases.⁴⁷⁵

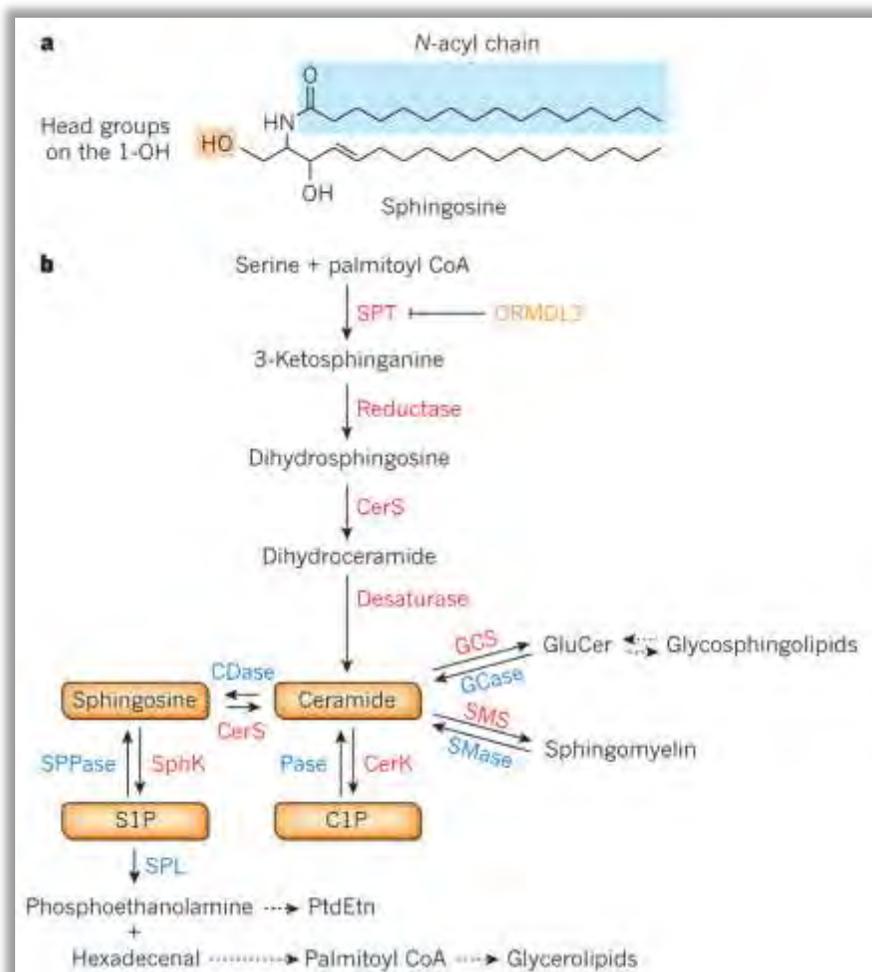


Figure 21: Structure (a) et biosynthèse de novo (b) du céramide.⁴⁷⁵ CDase: Céramidase; CerS: Céramide synthase; GCCase: Glucosylcéramidase; GCS: Glucosylcéramide synthase; Pase: Phosphatase; PtdEtn: Phosphatidyl éthanolamine; SMase: Sphingomyélinase; SMS: Sphingomyéline synthase; SPPase: Sphingosine phosphate phosphatase.

2- Métabolisme du céramide en sphingosine-1-phosphate

Malgré la diversité des composants du métabolisme des SLs, deux métabolites (le céramide et la sphingosine-1-phosphate (S1P)) ont suscité une attention particulière en raison de leurs effets pléiotropes sur des processus cellulaires tels que la croissance, la survie, l'angiogenèse, le trafic des lymphocytes, et la progression du cancer.⁴⁷⁴

Le clivage du céramide par les céramidases donne la sphingosine qui est phosphorylée par les sphingosine kinases 1 et 2 (SK1 et SK2) pour générer la S1P. La S1P peut être soit déphosphorylée par les S1P phosphatases (SPP) pour régénérer la sphingosine, ou dégradée par la S1P lyase (SPL) pour aboutir à des produits non sphingolipidiques: l'hexadécanal et la phospho-éthanolamine qui constituent le seul point de sortie de la voie des SLs.²⁸¹ (Figure 22)

L'équilibre entre la production et la dégradation de la S1P est étroitement régulé puisque la S1P est un lysophospholipide bioactif pléiotrope, qui exerce ses effets biologiques selon deux mécanismes.⁸²⁸ D'une part, la S1P peut agir comme un second messager intracellulaire en stimulant la prolifération et à l'inverse, en inhibant l'apoptose.⁷⁹⁸

D'autre part, la S1P peut être sécrétée pour activer des récepteurs spécifiques présents à la surface cellulaire. Ainsi, la S1P stimule des cascades de signalisation autocrine et paracrine qui induisent la migration cellulaire, l'angiogenèse, et la différenciation.⁶⁶⁷ En revanche, le céramide est principalement impliqué dans l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire, et la sénescence.²⁸¹

Les effets opposés du céramide et de la S1P et le fait que ces deux métabolites sphingolipidiques soient interconvertibles a abouti au dogme du rhéostat céramide / S1P postulant que le rapport de ces lipides détermine le destin des cellules.¹³⁴

Vu leur rôle clé dans la régulation de processus biologiques fondamentaux (prolifération, survie, et migration cellulaires, angiogenèse et réponses inflammatoires), les enzymes régulant la balance de ces deux SLs constituent une voie attrayante dans la recherche de thérapies ciblées.

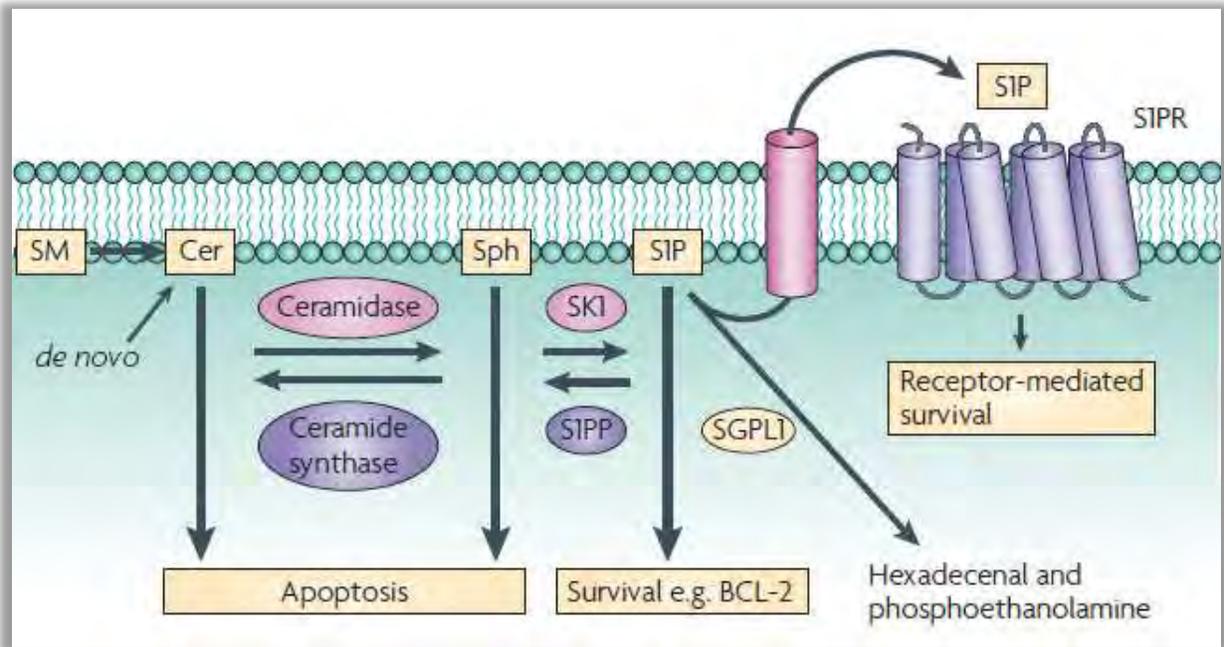


Figure 22: Rhéostat Céramide (Cer)/ Sphingosine (Sph)/ Sphingosine 1-Phosphate (SIP). ⁶⁶⁶ Cer: Céramide; SK1: Sphingosine kinase 1; Sph:Sphingosine; S1PP: S1P phosphatases; S1PR: Récepteur de la S1P; SM: sphingomyéline; SGPL1: S1P lyase.

2.1- Anabolisme de la S1P

Les sphingosine kinases (SK, ou SphK) sont une classe de kinases lipidiques qui ont été conservées pendant l'évolution. Elles sont exprimées chez les humains, les souris, les levures et les plantes, avec des homologues chez les vers et les mouches. Deux isoenzymes mammifères sont caractérisées jusqu'à ce jour: SK1 et SK2. Ces isoenzymes sont différemment régulées et possèdent des propriétés cinétiques, et des modes d'expression spatiale et temporelle distincts. Cependant elles disposent d'un même domaine catalytique qui contient une séquence consensus (SGDGX₍₁₇₋₂₁₎ K (R)) d'un site de liaison à l'ATP. Ce domaine leur permet de phosphoryler la sphingosine proapoptotique en un métabolite de survie, la S1P.⁷⁹⁹

2.1.1- Structure et isoformes des sphingosine kinases

Les gènes *Sphk1* et *Sphk2* sont situés respectivement au niveau des chromosomes 17q25.2 et 19q13.2. La taille des protéines correspondantes sont 43 kDa et 65 kDa, respectivement avec une similitude de 47% dans la région N-terminale et de 43% dans la région C-terminale. Les deux

enzymes possèdent cinq régions hautement conservées (C1-C5), avec le domaine catalytique à l'intérieur des régions C1-C3 et le site de liaison à l'ATP dans le domaine C2. La SK2 possède quatre domaines transmembranaires, tandis que la SK1 n'en a pas.^{13, 462, 799}

Trois isoformes d'épissage existent pour la SK1 (SK1a, b et c), ils diffèrent uniquement au niveau de l'extrémité N-terminale. SK1a (RefSeq NM 001142601) est l'isoforme le plus court, tandis que SK1b (RefSeq NM 021972) dispose de 14 acides aminés supplémentaires et comprend un site putatif de palmitoylation, ce qui pourrait expliquer sa localisation constitutive au niveau de la membrane plasmique. SK1c (RefSeq NM 182965) est l'isoforme le plus long avec 86 acides aminés supplémentaires par rapport à SK1a.⁶⁴⁶

La SK2 possède deux isoformes d'épissage, SK2a (SK2s, numéro d'accès Genbank™ AF 245447) et SK2b (SK2l, RefSeq NM 020126), qui diffèrent par 36 acides aminés. SK2b est exprimée en abondance dans plusieurs tissus humains et dans des cultures cellulaires.⁶⁴⁶

Malgré leur forte homologie structurale et leur produit commun, la S1P, les deux types de sphingosine kinase possèdent des propriétés différentes aux niveaux de l'activité catalytique, l'expression temporelle, la localisation cellulaire, et l'expression tissulaire, suggérant des rôles physiologiques distincts de ces deux enzymes.⁶⁴⁶

2.1.2- Rôles physiologiques des sphingosine kinases

La SK1 est une enzyme cytosolique constitutivement active. Son activité peut être augmentée par la phosphorylation ERK1/2-dépendante au niveau de la sérine 225, et la translocation à la membrane plasmique où elle phosphoryle son substrat la sphingosine pour générer la S1P.⁶⁴⁷ La SK2 est principalement localisée dans la mitochondrie⁸¹³ et au niveau du noyau, où elle inhibe la synthèse d'ADN et induit l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G1 / S.³³¹

Plusieurs travaux ont montré que ces deux enzymes joueraient des rôles distincts. Par exemple, l'inhibition de SK1 réduit l'incidence et la sévérité de la maladie dans un modèle murin d'arthrite induite par le collagène, alors que l'inhibition de SK2 induit un développement plus agressif de la maladie.⁴⁰⁹ Des rôles différents pour les deux SKs ont également été rapportés dans les lésions d'ischémie-reperfusion rénale.³⁵²

Au niveau cellulaire, les deux SKs utilisent le même substrat physiologique et génèrent le même produit, mais ont des rôles opposés. En effet, la SK1 favorise la survie et la prolifération cellulaires.^{281, 666} Sa surexpression, qui est associée à une augmentation de la production de S1P, stimule la croissance cellulaire et la transition G1/S du cycle cellulaire.⁵⁹⁴ Par exemple, la surexpression de la SK1 dans des fibroblastes NIH 3T3 favorise la croissance des cellules dans l'agar et la formation de tumeurs chez les souris, probablement en raison de son rôle dans la signalisation Ras, ERK1/2, suggérant un potentiel oncogène de cette kinase.^{563, 771, 910}

En accord avec ces observations, la forme dominante négative de la SK1 inhibe la signalisation mitogénique médiée par l'œstrogène dans les cellules MCF-7 et diminue leur capacité à former des tumeurs chez les souris nues.⁸¹⁷ De même, la SK1 est fréquemment surexprimée dans une variété de tumeurs solides, suggérant un rôle important dans la tumorigenèse humaine.^{207, 273}

En opposition au rôle mitogénique et anti-apoptotique attribué à la SK1, la SK2 supprime la croissance cellulaire et induit l'apoptose par la régulation de l'inhibiteur de la kinase cycline-dépendante p21, et par le renforcement de l'acétylation de l'histone H3.^{271, 730} Ce rôle pro-apoptotique pour la SK2 est appuyé par une étude démontrant que les cellules mésangiales de souris *Sphk2*^{-/-} sont plus résistantes à l'apoptose induite par la staurosporine que les cellules du phénotype sauvage ou *Sphk1*^{-/-}.³⁰⁸ De plus, le knock-down de la SK2 dans les cellules HEK293 bloque l'apoptose induite par le TNF- α ou le manque de sérum.⁵⁸⁸ Cependant, plusieurs études ont rapporté les effets stimulateurs de la SK2 sur la croissance de xénogreffes tumorales⁸⁸⁹ et la chimiorésistance du cancer du poumon.⁷⁴⁵ De plus, l'inhibition spécifique de la SK2 améliore l'apoptose et accroît la sensibilité aux chimiothérapies de nombreuses cellules cancéreuses.⁶⁴⁵

Des fonctions cellulaires redondantes ont été aussi rapportées pour les deux isoformes de sphingosine kinase. En effet, SK1 et SK2 auraient des effets identiques sur la migration induite par l'EGF des cellules du cancer du sein,²⁷² et la migration et l'invasion induites par le TGF- β des cellules du cancer de l'œsophage.⁵²⁶ Chez la souris, le simple knock-out de l'une des deux enzymes SK1 ou SK2 n'a aucun effet sur le développement et la reproduction, ce qui suggère que malgré leurs rôles cellulaires distincts, une déficience de l'une des deux isoformes semble être compensée par l'autre. Cependant, la rupture simultanée des deux SKs entraîne une carence de la S1P qui affecte sévèrement l'angiogenèse et la neurogenèse et provoque ainsi la létalité embryonnaire, ce qui indique un rôle crucial de la S1P au cours du développement.⁵³³

2.1.3- Modes d'activation des sphingosine kinases

Les SKs possèdent une activité catalytique intrinsèque, qui est indépendante des modifications post-traductionnelles générant ainsi des niveaux de base de la S1P dans la cellule. Cette activité basale est rapidement accélérée par la phosphorylation qui est stimulée par une variété de facteurs de croissance.^{13, 648} L'activité de la SK1 peut être stimulée rapidement et transitoirement par une large variété de facteurs de croissance tels que l'EGF, le PDGF. La SK2 est également activée par l'EGF ainsi que par l'ester de phorbol.^{16, 272, 302}

L'activation de la SK1 est déclenchée par la phosphorylation médiée par ERK1 / 2 de la Ser225. Cette phosphorylation induit la translocation de la SK1 et améliore son affinité et sa sélectivité de liaison à des microdomaines (radeaux lipidiques) de la membrane plasmique. L'acide phosphatidique et la phosphatidylsérine facilitent la rétention de la SK1 à la membrane plasmique où est concentrée la sphingosine.¹⁴³ La localisation de la SK1 à la proximité de son substrat, la sphingosine, se traduit par une augmentation des taux intracellulaires et extracellulaires de S1P.^{647, 649, 800} De façon intéressante, le variant d'épissage SK1b possède à son extrémité N-terminale une séquence de 14 acides aminés qui abrite un site de palmitoylation potentiel. Il a été suggéré que la palmitoylation, modification qui cible des protéines des radeaux lipidiques, conduit à la localisation constitutive de la SK1b à la membrane plasmique.⁶⁴⁶

La régulation et la fonction de la SK2 ont été moins étudiées. La SK2 possède une activité 10 fois moins spécifique en comparaison avec la SK1, vu qu'elle phosphoryle une gamme plus large de substrats à bases sphingoïdes tels que la D-érythro-dihydrosphingosine, la D,L-thréo-dihydrosphingosine et la phytosphingosine.^{462, 704} Il a été rapporté que ERK1/2 se lie à la SK2 et la phosphoryle au niveau de Ser351 et Thr578, améliorant ainsi son activité enzymatique.²⁷⁰

2.1.4- Localisation subcellulaire des sphingosine kinases

La SK1 se situe principalement dans le cytosol et au niveau de la membrane plasmique après sa stimulation.⁶⁴⁹ La SK2 est principalement localisée dans le cytosol. Sa phosphorylation au niveau de Ser383 ou Ser385 par la protéine kinase D provoque son export nucléaire.¹⁵⁰ La SK2 peut également se trouver dans le réticulum endoplasmique où elle semble avoir des fonctions pro-apoptotiques.^{331, 473} De même elle a été repérée dans les mitochondries, où elle produit la

majorité de la S1P mitochondriale. De façon intéressante, la respiration mitochondriale a été réduite chez les souris knock-out pour la SK2 dû à l'assemblage aberrant et à l'activité réduite du complexe IV (cytochrome oxydase) de la chaîne de transport d'électrons.⁸¹³

Les SKs peuvent encore être libérées dans le milieu extracellulaire *via* des voies de sécrétion non classique.⁸³² La SK1 peut être sécrétée à l'extérieur des fibroblastes sous forme d'un complexe avec FGF1 en réponse au stress cellulaire.⁷⁸⁹ Récemment, il a été montré que la SK1 est excrétée dans des vésicules à partir des cellules tumorales humaines.⁶⁹⁷ La SK2b peut être sécrétée après clivage de son extrémité N-terminale par la caspase-1 dans les cellules apoptotiques.^{13, 887} Le mécanisme d'action extracellulaire des SKs n'est pas clair. La dégradation de la SM en céramide puis en sphingosine se produirait au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique et de l'ATP serait libéré par les cellules pour la production extracellulaire de la S1P.⁸³²

2.2- Catabolisme de la S1P

La dégradation de la S1P fait appel à deux voies: une dégradation réversible par les SPPs et une dégradation irréversible catalysée par la SPL.

2.2.1- Sphingosine-1-phosphate lyase (SPL)

La SPL est une enzyme qui catalyse la dégradation irréversible de la S1P par le clivage de la liaison C2-C3 de sa base sphingoïde pour générer la phospho-éthanolamine et l'hexadécanal. Les produits générés suite à la dégradation de la S1P peuvent servir de précurseurs au métabolisme des phospholipides. Cette interconnexion entre les produits finaux du catabolisme des SLs et de la biosynthèse des phospholipides montre la position charnière de la SPL entre ces deux voies métaboliques lipidiques.³⁵

2.2.1.1- Structure protéique et topologie de la SPL

Le gène codant pour la SPL humaine (*SGPL1*) est localisé sur le chromosome 10q21, il code pour une protéine de 568 acides aminés avec une masse moléculaire de 63,5 kDa. Les études de mutagenèse dirigée ont défini plusieurs résidus essentiels au fonctionnement de cette protéine, y

compris une séquence de 20 acides aminés (344-364), qui comprend des résidus de lysine potentiellement impliqués dans la liaison au cofacteur (K353) et au substrat S1P (K359, K340 et K303). Deux cystéines conservées en position 218 et 317 semblent nécessaires pour maintenir le repliement des protéines, et un domaine N-terminal hydrophobe s'avère crucial pour la localisation de la SPL au niveau de la membrane.⁸⁶⁴

Les études d'immunofluorescence et de fractionnement subcellulaire ont confirmé l'emplacement principal de la SPL dans le réticulum endoplasmique avec le site actif du côté cytosolique, toutefois la possibilité que cette enzyme soit localisée dans d'autres organites n'a pas été définitivement exclue.^{332, 863} La SPL n'a pas été détectée dans le sérum, le plasma ni l'espace extracellulaire. Elle semble être limitée à l'environnement intracellulaire.³⁵

2.2.1.2- Distribution tissulaire de la SPL

Chez la souris et le rat, l'activité et l'expression les plus élevées de la SPL ont été rapportées dans l'intestin grêle, le côlon, le thymus, le foie et l'épithélium olfactif muqueux. L'expression la moins marquée a été signalée dans le cœur et le cerveau. Quant à son expression leucocytaire, la SPL est exprimée dans les lymphocytes et certaines cellules inflammatoires, mais son activité dans les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques, et les neutrophiles n'a pas été totalement caractérisée. La SPL est absente dans les érythrocytes et les plaquettes qui stockent la S1P et la secrètent après activation.³⁵

2.2.1.3- SPL, apoptose et cancer

Le rôle potentiel de la SPL dans la régulation du destin cellulaire en réponse au stress a été étudié dans plusieurs systèmes. Une surexpression de SPL sensibilise les cellules mammifères à la privation en sérum, aux dommages de l'ADN ainsi qu'aux médicaments tels que la cisplatine, la carboplatine, la daunorubicine et l'étoposide. A l'inverse, le knock-down de la SPL diminue l'apoptose. Ainsi, il a été montré que la capacité de la SPL à promouvoir l'apoptose nécessiterait l'action de p53 et p38.^{599 528, 688}

De plus, il a été rapporté que l'expression et l'activité de la SPL sont régulées négativement au cours de la tumorigénèse intestinale dans un modèle de souris $Apc^{Min/+}$ ainsi que dans les

échantillons de cancer du côlon humain comparativement aux tissus sains adjacents.⁵⁹⁹ Ces notions sont cohérentes avec le fait que le gène *SGPL1*, codant pour SPL, fait parti d'un ensemble de gènes qui sont régulés négativement de façon significative dans les tissus tumoraux métastatiques comparativement aux tumeurs primaires chez les mêmes patients.⁶⁷⁷

L'ensemble de ces données indique que la SPL pourrait réguler positivement les voies de suppression de la croissance tumorale, tandis que la perte de l'expression ou de l'activité de cette enzyme pourrait contribuer à la tumorigénèse.¹²⁶ Ainsi, la SPL pourrait être exploitée dans une approche thérapeutique adjuvante améliorant la réponse anti-tumorale.

2.2.1.4- Régulation de la SPL

Deux mécanismes impliquant le PDGF et les facteurs de transcription de la famille GATA semblent être importants dans la régulation transcriptionnelle de la SPL.^{113, 600} Les facteurs de transcription de la famille GATA sont impliqués dans le développement endodermique et le maintien de la différenciation des cellules intestinales chez les vertébrés et les invertébrés.⁵³⁸ Le facteur de croissance PDGF est un régulateur important de la croissance, la migration et la différenciation cellulaires, il contribue aux processus physiologiques (ex: cicatrisation des plaies et production de l'ECM), et pathologiques (ex: inflammation et cancer).¹⁴

Les souris knock-out pour la SPL ont révélé un phénotype évoquant les défauts de la signalisation PDGF, y compris les anomalies de développement vasculaire, l'hémorragie, les défauts squelettiques et les défauts de la migration cellulaire.⁷⁴² Ainsi en régulant les niveaux de la SPL et de la SK1, le PDGF est capable d'affecter le développement vasculaire grâce au contrôle serré des pools de S1P disponibles pour la signalisation par l'intermédiaire de son récepteur S1P1, médiateur principal de la migration cellulaire.^{302, 593}

D'autres mécanismes pourraient contribuer à la régulation transcriptionnelle du gène *SGPL1*. En effet, ce gène semble être une cible de la protéine Sin3A qui appartient à un complexe corépresseur impliqué dans la régulation du développement embryonnaire, de la progression du cycle cellulaire, de la réparation d'ADN, de la survie et la prolifération cellulaires et de l'activation de p53.¹³⁷

Outre la régulation transcriptionnelle, une régulation post-transcriptionnelle de la SPL a été signalée suite à l'observation de la nitrosylation des résidus de thyrosine 356 et 366. La nitrosylation protéique est événement potentiellement réversible et biologiquement pertinent qui peut interférer avec la liaison de cette enzyme à son substrat via la modification de la charge des tyrosines présentes dans le site actif de la SPL.³⁵

2.2.2- Sphingosine-1-phosphate phosphatase (SPP)

Les SPPs sont des enzymes qui déphosphorylent la S1P pour générer la sphingosine résultant en l'inactivation de la S1P.⁴²⁷ Les SPPs ont d'abord été identifiées chez la levure et se sont montrées des régulateurs importants de la réponse au stress thermique.^{488, 496} Deux gènes qui codent pour les SPPs ont été identifiés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*: LBP1 / YSR2 / LCB3 et LBP2 / YSR3.⁴⁹⁷ Les homologues mammifères de ces gènes sont *SPP1* et *SPP2*. Chez l'homme les gènes codant pour SPP1 et SPP2 se trouvent sur les chromosomes 14q23.1 et 2q36.3, respectivement.^{428, 487, 584}

Ces SPPs appartiennent à la famille des phosphates phosphohydrolases lipidiques (LPPs) mais ne présentent qu'une faible homologie avec cette famille au niveau de trois domaines présentant des résidus conservés. Contrairement aux LPPs, les SPPs présentent une sélectivité accrue pour les substrats sphingolipidiques. De plus, les SPPs sont localisées au niveau du réticulum endoplasmique (RE) alors que les LPPs résident dans la membrane plasmique et sont qualifiées d'ecto-phosphatases qui atténuent l'action agoniste du LPA aux récepteurs de la S1P.^{427, 799}

Malgré la similitude des SPPs mammifères au niveau de l'activité enzymatique et de leur localisation au RE, ces deux enzymes possèdent des propriétés d'expression différentes. En effet, SPP1 est surtout exprimée au niveau du placenta et des reins, tandis que SPP2 est plus abondante dans le cerveau, le coeur, le côlon, le rein, l'intestin grêle et les poumons.⁴⁶³

Les souris *Sgpp1*^{-/-}, déficientes pour SPP1, sont normales à la naissance, mais présentent des retards de croissance ainsi qu'une desquamation de leur peau au cours de la première semaine de vie. La plupart décède avant le sevrage. Les souris *Sgpp1*^{-/-} survivantes présentent de multiples anomalies épidermiques malgré le développement normal de la barrière épidermique durant

l'embryogenèse. Ceci montre l'importance de la SPP1 dans le maintien de l'homéostasie épidermique et dans la prévention d'un phénotype semblable à l'ichtyose.¹¹

Des travaux rapportent également que SPP1 contrôle l'autophagie induite par le stress du réticulum endoplasmique,⁴³⁹ le tonus vasculaire,⁶⁴⁰ les niveaux de céramide régulant l'apoptose, et le trafic du céramide du réticulum endoplasmique vers le corps de Golgi.⁴²⁷ L'inhibition du gène SPP1 confère aux cellules cancéreuses une résistance au TNF- α et à l'agent chimiothérapeutique daunorubicine.³⁵⁵ Les effets de la SPP2 sur la régulation du métabolisme des SLs sont moins bien connus. Cette isoforme serait cependant activée durant la réponse inflammatoire.⁵¹³

3- Signalisation par la S1P

La S1P agit comme un second messager intracellulaire et comme un ligand extracellulaire à mode d'action autocrine ou paracrine en activant les récepteurs à la S1P.⁴⁷⁴ (Figure 23)

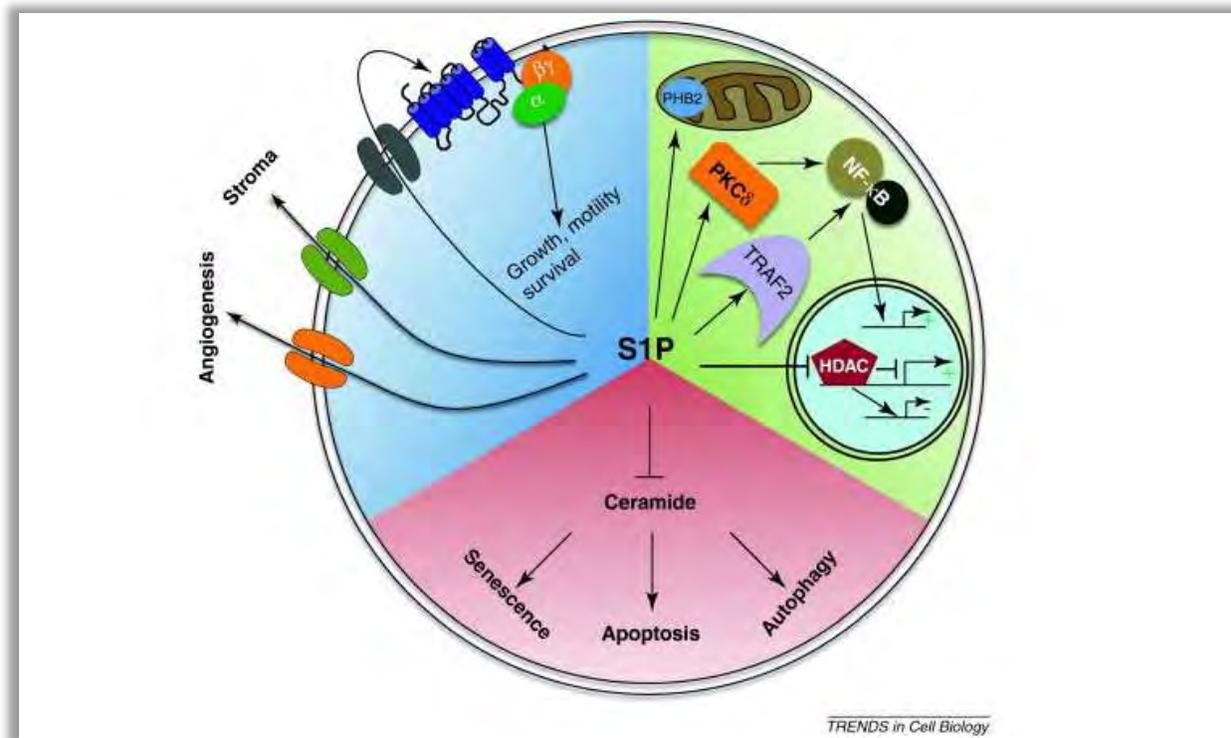


Figure 23 : Actions intracellulaires (zone rouge et verte) et extracellulaire (zone bleu) de la S1P.⁴⁷⁴

3.1- L'activité intracellulaire de la S1P

Beaucoup de preuves ont attribué le rôle de messenger intracellulaire à la S1P.⁷⁹⁹ Cependant, pendant près de deux décennies, aucune cible intracellulaire de la S1P n'avait été identifiée. Récemment, cela a changé avec la démonstration que la S1P lie et modifie la fonction de différentes protéines intracellulaires.

3.1.1- Histones désacétylases (HDAC)

Il a été récemment montré que les noyaux cellulaires contiennent des quantités significatives de S1P générées par la SK2. Cette kinase se trouve dans un complexe répresseur avec l'histone H3 et des histones désacétylases. Elle produit la S1P qui régule l'acétylation des histones au niveau de résidus spécifiques de lysine, et ainsi la transcription des gènes tels que l'inhibiteur de la kinase cycline-dépendante p21, et le régulateur de la transcription c-fos.²⁷¹ Ces résultats indiquent que la S1P produite dans le noyau par la SK2 influence l'équilibre dynamique de l'acétylation des histones et donc permet la régulation épigénétique de gènes cibles.⁴⁷⁴

3.1.2- Facteur associé au récepteur du TNF (TRAF2)

TRAF2 est une protéine adaptatrice impliquée dans l'activation de NF- κ B en réponse au TNF- α , elle est connue pour lier SK1 et stimuler son activité.⁹¹¹ Récemment, il a été montré que la S1P est un cofacteur nécessaire à l'activité E3 ligase de TRAF2, à la polyubiquitination consécutive de la kinase RIP1, et à l'activation de NF- κ B.¹⁵ Ces données montrent l'importance de l'axe SK1/S1P dans les réponses inflammatoires et immunitaires.^{15, 474}

3.1.3- Protéine Kinase C δ (PKC δ)

La SK1 joue un rôle clé dans un certain nombre de réponses immunitaires, notamment le choc septique. Des travaux ont montré que la S1P ou la SK1 recombinante incubée avec de la sphingosine et de l'ATP pour produire de la S1P, active la PKC δ *in vitro*. Celle-ci joue un rôle dans l'activation de NF- κ B induite par les endotoxines. Ces données soulignent l'importance de l'axe SK1/S1P en tant que cible thérapeutique pour le choc septique.⁶⁶⁴

3.1.4- Prohibitine 2 (PHB2)

PHB2, une protéine hautement conservée qui régule l'assemblage et la fonction mitochondriale, semble lier la S1P *in vitro* et *in vivo*.⁸¹³ PHB2 est localisée principalement dans la membrane mitochondriale interne, où elle forme avec PHB1 un grand complexe macromoléculaire impliqué dans la biogenèse et le métabolisme mitochondrial.²⁶ L'interaction de PHB2 avec la S1P générée par la SK2 mitochondriale est importante pour l'assemblage du complexe cytochrome c oxydase et pour la respiration mitochondriale. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour élucider le rôle de la S1P dans la mitochondrie pendant le stress oxydatif et le vieillissement.⁸¹³

3.2- L'activité extracellulaire de la S1P

La S1P intracellulaire est incapable de migrer à travers la membrane plasmique en raison de sa tête polaire. Son transport à travers la membrane se passe via des transporteurs particuliers : la famille des transporteurs ABC (ABCC1⁵³² et ABCG2⁸²⁷), ou le transporteur SPNS2³⁰⁰. Le transporteur utilisé dépend du type cellulaire en jeu. Par exemple, les mastocytes exportent la S1P via le transporteur ABCC1⁵³², alors que les astrocytes et les plaquettes utilisent le transporteur ABCA1^{385, 736}

Les cellules endothéliales ont la particularité d'exporter la S1P grâce au transporteur SPNS2. Cette protéine à 12 domaines transmembranaires, dont l'expression semble relativement spécifique des cellules vasculaires endothéliales, a d'abord été identifiée chez la drosophile. La souris déficiente pour SNPS2 présente une diminution de 60% de la S1P circulante et un défaut majeur dans la migration lymphocytaire.³⁰⁰

Lorsque la S1P est sécrétée à l'extérieur de la cellule, elle peut se lier avec une affinité élevée à cinq récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G : S1P1, 2, 3, 4, et 5 correspondant respectivement aux gènes de différenciation endothéliale EDG 1, 5, 3, 6, et 8. L'expression de ces récepteurs varie selon le type cellulaire impliqué. Par exemple, S1P1, S1P2 et S1P3 sont largement exprimés dans les tissus des mammifères, tandis que l'expression de S1P4 est principalement confinée aux tissus lymphoïdes et hématopoïétiques, et l'expression du S1P5 est réservée au système nerveux central.⁷²⁸

Ces récepteurs sont couplés à une variété de protéines G qui régulent de nombreuses voies de signalisation en aval. Ceci confère à la S1P des effets biologiques diverses en fonction du type cellulaire, et de l'expression différentielle des protéines G et des S1PRs.⁶²⁴ (Figure 24)

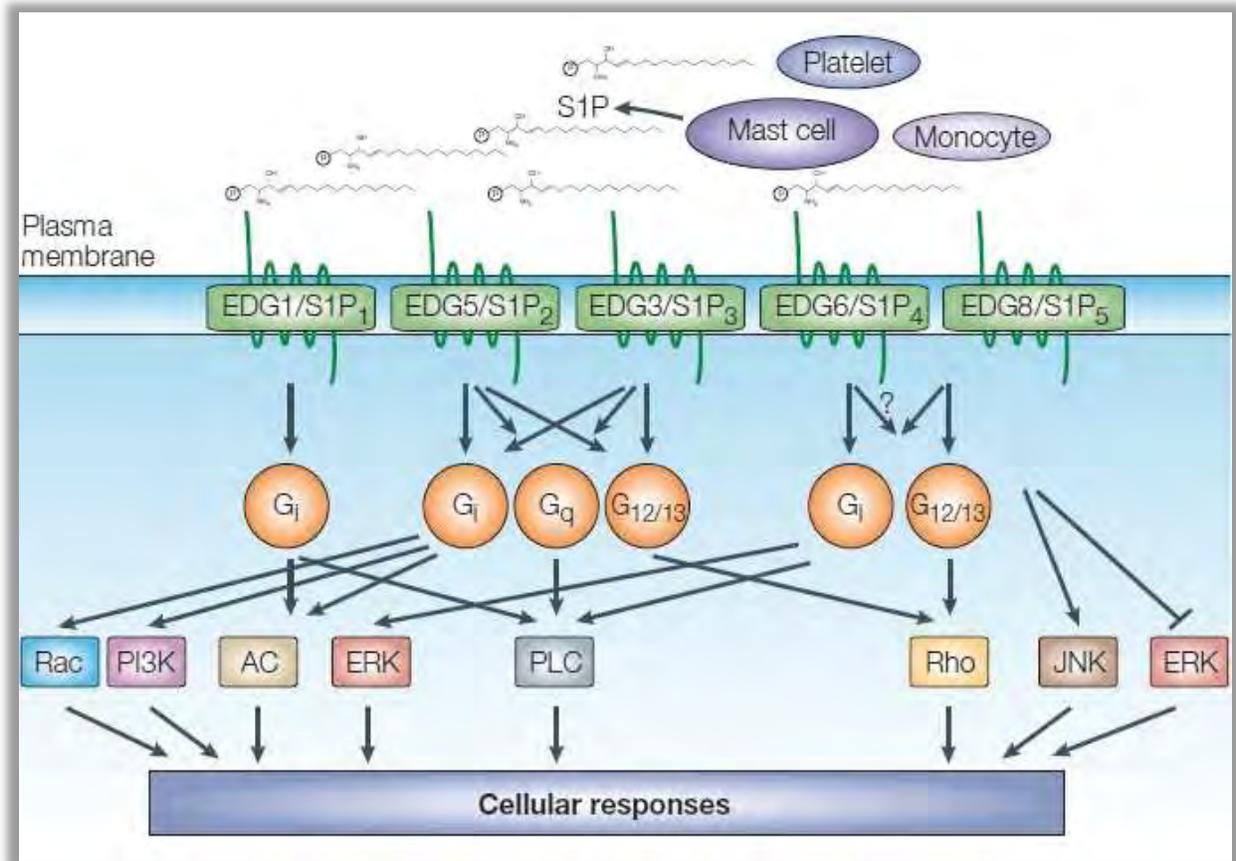


Figure 24 : Activité extracellulaire de la S1P : signalisation via cinq récepteurs couplés aux protéines G.⁷⁹⁹

3.2.1- S1P1/EDG-1

La S1P, contrairement aux lipides qui lui sont structurellement similaires (sphingosine, céramide-1-phosphate, LPA), est un ligand qui possède une affinité élevée pour le récepteur S1P1. L'analyse de la liaison de la S1P aux récepteurs S1P1 mutants évoque que les résidus cationiques ARG 120 et ARG 292 interagissent avec le groupement phosphate de la S1P tandis que le résidu anionique GLU 121 interagit avec l'ion ammonium de la queue de la S1P.^{436, 616, 945}

L'EDG-1 est un récepteur ubiquitaire dont l'ARNm a été détecté dans une variété de cultures cellulaires telles que les cellules endothéliales, les fibroblastes embryonnaires, et les cellules de glioblastome, ainsi que dans des tissus divers de souris et de rats, tels que le cœur, le cerveau, les poumons, le thymus, et la peau... Ainsi des fonctions cellulaires et physiologiques diverses ont été attribuées au récepteur S1P1.³⁸²

Certaines études ont rapporté l'importance de ce récepteur dans la survie, la prolifération, et la migration des cellules endothéliales, des péricytes, et d'autres types cellulaires comme les cellules ovariennes. L'absence de S1P1 touche le rassemblement des péricytes autour des vaisseaux sanguins en développement, conduisant à une maturation incomplète de ces vaisseaux. Ceci peut être attribué à un défaut de migration des péricytes en réponse à agents chimio-attractifs tels que le PDGF.^{302, 9, 12, 17}

L'activité fonctionnelle de S1P1 dépend de son couplage spécifique et exclusif à la protéine Gi hétérotrimérique, qui régule l'activation de la voie ERK, les augmentations modestes de calcium cytosolique (par l'activation de PLC β), et l'inhibition de l'adénylcyclase.^{382, 435, 897}

Outre la protéine Gi, le récepteur S1P1 peut être couplé à de petites GTPases Rho et Rac. S1P1 induit d'une part la différenciation morphogénétique et l'augmentation des niveaux de la P-cadhérine d'une manière Rho-dépendante, et d'autre part le rassemblement de l'actine corticale et la migration cellulaire d'une manière Rac-dépendante.³⁸²

3.2.2- S1P2/EDG-5/AGR16/H218

L'analyse de la séquence de ce récepteur a révélé qu'il possède une homologie de 50-60% avec le récepteur S1P1. La S1P est un ligand de haute affinité pour S1P2 et leur liaison peut être concurrencée par la dihydro-S1P.³⁸²

Malgré le profil d'expression similaire de S1P1 et S1P2, ces récepteurs semblent différer sur le plan fonctionnel.³⁸² En effet, S1P1 est connu pour promouvoir la migration de différents types cellulaires en réponse à la S1P et d'autres agents chimio-attractifs tels que le PDGF, alors que S1P2 inhibe la migration, induite par la S1P, des cellules CHO.^{391, 589}

S1P2 diffère également de S1P1 en termes de son influence sur la prolifération, la survie et l'organisation du cytosquelette. En effet, contrairement à S1P1, S1P2 promeut l'apoptose et induit la formation de fibres de stress Rho-dépendantes.³⁸²

S1P2 est couplé à des protéines G hétérotrimériques multiples (Gi, Gq et G13) ce qui lui permet d'influer sur plusieurs voies en aval telles que les voies PLC/ IP3/ Ca²⁺, adénylyl cyclase, et MAPK (ERK-1 /-2, JNK et p38).^{19, 391, 897} Il est également capable de lier les petites GTPases Rho et Rac; il active Rho et induit la formation des fibres de stress, ainsi que la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine, mais inhibe Rac et bloque la migration cellulaire.⁵⁸⁹

3.2.3- S1P3/EDG-3

La séquence d'acides aminés de S1P3 est d'environ 50% similaire à S1P1 et S1P2. Vu cette similitude, il n'est pas surprenant que la S1P soit un ligand de haute affinité pour S1P3.³⁹¹ La liaison de S1P au S1P3 a été efficacement concurrencée par la dihydro-S1P et faiblement concurrencée par la sphingosine.¹⁹

Tout comme les récepteurs discutés ci-dessus, S1P3 est exprimé dans de nombreux tissus et lignées cellulaires, ce qui lui attribue de nombreuses fonctions physiologiques. Ce récepteur est capable de promouvoir la migration de différents types cellulaires.⁶⁰⁷ Il régule l'organisation du cytosquelette, l'assemblage des jonctions adhérentes, et la différenciation morphogénétique des cellules HUVEC.⁴³⁴ Il peut aussi favoriser la prolifération et la survie cellulaires, événement observé chez les hépatomes de rat transfectés par S1P3.¹⁸

S1P3 peut être couplé à de multiples protéines G hétérotrimériques (Gi, Gq et G13), et contrôle ainsi les voies de signalisation MAPK, adénylyl cyclase, et PLC/IP3/ Ca²⁺. Il peut de même lier les petites GTPases Rho et Rac. Les oligonucléotides antisens dirigés contre S1P3 altèrent l'activation induite par la S1P de ces GTPases dans les cellules HUVEC.^{589, 607}

3.2.4- S1P4/EDG-6

S1P4 est un récepteur de haute affinité pour la S1P, et de faible affinité pour la SPC.⁸⁵⁹ A la différence des autres récepteurs de la S1P décrits ci-dessus, S1P4 possède un profil d'expression

très limité, et confiné aux tissus et cellules du système hématopoïétique. Son ARNm a été détecté dans le thymus, la rate, la moelle osseuse, et les leucocytes périphériques. Ce profil d'expression étroit et spécifique évoque l'importance du S1P4 dans le système immunitaire.³⁸²

S1P4 semble être couplé à la protéine G hétérotrimérique, Gi. Cette notion repose sur le fait que la toxine pertussique altère l'activation médiée par S1P4 de la voie ERK-1/-2. La liaison de S1P4 à d'autres protéines G hétérotrimériques (Gq et G12/13), et aux petites GTPases Rho et Rac reste encore à déterminer. Malgré le manque de connaissance sur le couplage de S1P4 aux protéines G hétérotrimériques, il a été démontré que ce récepteur induit l'activation des voies ERK-1/-2, PLC/ IP3 / Ca²⁺, et adénylcyclase.^{382, 859}

3.2.5- S1P5/EDG-8/NRG-1

Comme les autres membres de cette famille, S1P5 est un récepteur de haute affinité à la S1P. La SPC peut agir comme un agoniste faible pour S1P5. Comme S1P4, S1P5 représente un profil d'expression intéressant. Ce récepteur est principalement exprimé dans le cerveau, en particulier dans les faisceaux de substance blanche. Il a été aussi détecté dans la peau et la rate.^{334, 483}

Fonctionnellement, S1P5 est connu pour réprimer la prolifération induite par le sérum d'une manière qui est insensible à la toxine de pertussique, mais sensible à l'orthovanadate, ce qui suggère que les phosphatases, mais pas la protéine Gi, sont en aval de S1P5.⁴⁸³

Certaines études indiquent que S1P5 peut se coupler aux protéines G hétérotrimériques Gi et G12 mais pas à Gq ni Gs. Le couplage potentiel de S1P5 aux petites GTPases Rac et Rho reste à déterminer.^{334, 483}

En aval, des protéines G hétérotrimériques, S1P5 peut inhiber l'adénylcyclase d'une manière sensible à la toxine pertussique. En outre, S1P5 est capable d'activer p54 JNK/SAPK et d'inhiber l'activation de ERK-1 / -2 induite par le sérum d'une manière indépendante de Gi.^{334, 483}

La compréhension de la signalisation de ces récepteurs ouvre la porte à l'utilisation de plusieurs agonistes et antagonistes qui modulent leurs fonctions, régulant ainsi la physiologie cellulaire et certaines pathologies impliquant le métabolisme de la S1P.³⁸²

4- S1P et système immunitaire

Les cellules du système immunitaire expriment les récepteurs à la S1P, ce qui affecte la survie, la migration et la sécrétion de cytokines par ces cellules.^{244, 253} (Figure 25)

4.1- S1P et neutrophiles

Les neutrophiles sont des cellules immunitaires impliquées dans la défense contre les microbes et dans les lésions tissulaires résultant de l'inflammation. Suite à leur activation, les neutrophiles subissent une large altération de leur expression génique pour intensifier la réponse inflammatoire. Au cours de cette réponse, les neutrophiles circulants s'attachent par des molécules d'adhésion aux cellules endothéliales activées puis migrent vers les sites de lésion, où ils libèrent des substances toxiques, comme les radicaux oxygénés et les enzymes qui détruisent les tissus infectés, ainsi que les tissus normaux environnants.⁹³⁷

L'utilisation de dihydrosphingosine (DHS), qui inhibe les SKs, a permis de montrer que le TNF- α est capable de stimuler la production de l'anion superoxyde via l'activation de SKs. De même, la N, N-diméthylsphingosine (DMS), qui inhibe les SKs, est capable de bloquer le recrutement l'activation et la dégranulation des neutrophiles, ainsi que la génération de l'anion superoxyde par ces cellules.⁴⁷⁸ Ces résultats démontrent le rôle clé de la SK dans la régulation de la fonction des neutrophiles.^{328, 570}

4.2- S1P et cellules dendritiques (DC)

Les DC prélevées à partir des poumons murins ou celles dérivées *in vitro* à partir de la moelle osseuse expriment toutes les S1PRs, notamment S1P4. L'expression des récepteurs S1P1 et 3 est particulièrement augmentée durant la maturation des DC *in vitro*.^{479, 700}

Outre son rôle dans la migration des cellules dendritiques, la S1P semble affecter la polarisation fonctionnelle des DC ainsi que des lymphocytes T après exposition aux produits bactériens. En effet, l'exposition des DC dérivées de monocytes humains à la S1P pendant leur maturation en présence du lipopolysaccharide (LPS), altère leur capacité à initier la réponse Th1 et favorise la réponse Th2 des lymphocytes T CD4⁺ naïfs.^{329, 412, 549}

Le transfert adoptif des DC, préalablement traitées par le FTY720, qui bloque le S1P1, dans le thymus empêche le priming des cellules Th2 ainsi que d'autres réponses immunes. Ceci montre l'importance de ce récepteur dans l'initiation des réponses immunitaires par les DC matures.⁷⁰⁰

Dans un modèle de choc septique induit par le LPS, le récepteur S1P3 s'est avéré essentiel pour l'induction de la production d'IL-1 β et sa diffusion dans la circulation, amplifiant ainsi la réponse inflammatoire innée et la coagulation. La résolution de l'inflammation traduite par la diminution des niveaux d'IL-1 β a été observée chez les souris déficientes en SK1 et S1P3.⁵⁶⁷

Ainsi, les S1PRs sont essentiels non seulement au recrutement des DC mais aussi à leur programmation phénotypique et à l'activation des lymphocytes T médiée par ces cellules, modulant ainsi les réponses immunitaires.⁷⁰⁰

4.3- S1P et mastocytes

L'activation du récepteur de l'IgE, Fc ϵ RI, présent sur les mastocytes active SK1 et SK2, et induit la production et l'export de la S1P.^{531, 596} La S1P exportée atteint un niveau maximal dans le milieu entourant les mastocytes quelques heures après l'engagement de leur Fc ϵ RI. Puis, elle agit sur les mastocytes d'une manière autocrine par l'intermédiaire des récepteurs S1P1 et S1P2, et sur les cellules environnantes d'une manière paracrine.^{356, 592, 660}

La perte du récepteur S1P2 inhibe la dégranulation des médiateurs allergiques tels que l'histamine par les mastocytes, tandis que la perte du récepteur S1P1 se traduit par une diminution du chimiotactisme de ces cellules. L'effet positif du S1P1 sur la migration est neutralisé par l'expression du S1P2.^{356, 928}

Les études utilisant des mastocytes dérivés à partir de progéniteurs hépatiques embryonnaires provenant de souris déficientes en SK1 et/ou en SK2, ont montré que la SK2 est principalement responsable de la phosphorylation de la S1P et de la signalisation en aval. Les conséquences fonctionnelles de la déficience en SK2 dans les mastocytes regroupent la diminution de la dégranulation et de la production de diverses cytokines et d'eicosanoïdes, qui sont les médiateurs clés de la réponse allergique.^{595, 700}

Or, malgré l'importance attribuée à la SK2 dans la génération de la S1P au cours des études réalisées chez les souris déficientes, la SK1 s'est avérée la source dominante de la S1P dans des études réalisées sur des mastocytes humains. L'étude des fonctions des SKs dans les mastocytes humains cutanés a révélé que la SK1 est importante pour la dégranulation et la migration vers l'antigène et vers la chimiokine CCL2 (ou MCP1), alors que la SK2 affecte plus particulièrement la production de cytokines.⁵⁹⁸

Il est encore difficile de savoir si la SK1 et la SK2 diffèrent dans leurs rôles fonctionnels en fonction de la population des mastocytes ou de l'espèce étudiée. La résolution de cette question est importante vu que les mastocytes constituent des cibles cellulaires thérapeutiques potentielles dans des maladies telles que l'asthme, la dermatite allergique ou d'autres maladies allergiques.⁷⁰⁰

4.4- S1P et macrophages

Les macrophages péritonéaux provenant d'un modèle murin d'athérosclérose, et traités avec du FTY720 ont montré une diminution de la production de marqueurs pro-inflammatoires TNF- α et IL-6 en réponse au LPS. Ainsi, le traitement par le FTY720 inhibe la polarisation des macrophages vers le phénotype M1 pro-inflammatoire induit par le LPS et favorise l'activation du phénotype M2 anti-inflammatoire induit par l'IL-4. Ceci explique l'effet protecteur de cet immunosuppresseur contre les lésions d'athérosclérose. Cet effet est probablement dû à une activation plutôt qu'une inhibition des S1PRs induite par le FTY720. En effet, des concentrations nanomolaires de S1P exogène ou l'utilisation du SEW2871, un agoniste spécifique du S1P1, bloquent la production induite par le LPS des marqueurs TNF- α , IL-12 et iNOS associés au phénotype M1.^{322, 571} De façon intéressante, les effets de la S1P exogène ou du SEW2871 en réponse au LPS, étaient moins marqués dans les macrophages péritonéaux provenant de souris déficientes en S1P2 par rapport à ceux prélevés de souris sauvages, suggérant un rôle majeur de ce récepteur sur la polarisation des macrophages.^{162, 322}

Au niveau tumoral, il a été montré que la SK2 des cellules du cancer de sein MCF-7 en apoptose sont capables de polariser les macrophages vers un phénotype M2 anti-inflammatoire. La S1P générée favorise la survie de ces macrophages.^{888, 890}

Ainsi, dans certaines conditions pathologiques telles que l'athérosclérose ou le cancer, des élévations extracellulaires du taux de S1P pourraient induire un «switch» du phénotype M1 pro-inflammatoire vers un phénotype M2 anti-inflammatoire des macrophages, et affecter ainsi la progression de la maladie.⁷⁰⁰ Ainsi, une meilleure compréhension du rôle de la S1P et de ses récepteurs dans la différenciation des macrophages *in vivo* pourrait fournir de nouvelles approches thérapeutiques capables de modifier l'équilibre M1/M2 des macrophages.⁵⁷¹

4.5- S1P et lymphocytes

Le rôle de la S1P dans le système immunitaire a été pleinement apprécié suite à l'utilisation du FTY720, un agent immunomodulateur qui est structurellement similaire à la sphingosine.^{70, 115, 486} Après phosphorylation par la SK2, le FTY720 agit comme un agoniste pour quatre des cinq récepteurs à la S1P (S1P1, 3, 4 et 5). Toutefois, un traitement chronique avec le FTY720 conduit à "l'antagonisme fonctionnel" du S1P1, probablement en raison de la disparition de ce récepteur de la surface cellulaire (Cf. partie 6.1.1 pour la description du mécanisme)^{254, 508} Après injection, le FTY720 empêche la sortie des lymphocytes provenant du thymus et des organes lymphoïdes secondaires. Ce phénomène est régulé par S1P1, cependant, les mécanismes mis en jeu demeurent encore discutés.⁴⁴⁴ De façon intéressante, le FTY720 inhibe la migration des lymphocytes sans entraîner d'altération significative des autres fonctions lymphocytaires, y compris la prolifération en réponse à la stimulation par un antigène.⁶⁴⁴

Les récepteurs à la S1P sont exprimés par les lymphocytes, les cellules endothéliales et d'autres populations cellulaires qui pourraient réguler ensemble la mobilisation lymphocytaire. La sortie des cellules T mûres du thymus dans la circulation dépend de l'expression du récepteur S1P1 puisque les souris surexprimant ce récepteur montrent une abondance de cellules T dans le sang et la lymphe.¹¹⁴ Cette surexpression est aussi associée à une inhibition de la prolifération et la maturation des cellules T ainsi qu'à une augmentation du taux d'IgE et une diminution de la réponse médiée par les cellules Th1. A l'inverse, la régulation négative de son expression dans un modèle DO11.10 TCR de souris transgéniques, contribue à la rétention et la prolifération des cellules présentatrices de l'antigène dans les ganglions lymphatiques.^{155, 256}

Le récepteur S1P1 induit la migration et la prolifération des L T CD4⁺ et régule leurs phénotypes fonctionnels en inhibant la production d'IFN γ ou en augmentant la production d'IL-4.^{155, 256, 881} Le traitement des cellules T CD4⁺ en présence de l'IL-1 β , l'IL-6 et de TGF- β 1 conduit à une polarisation vers un phénotype Th17 de façon dépendante du S1P1. Ce processus est bloqué par les cytokines IFN γ ou IL-4 provenant respectivement des lymphocytes Th1 et Th2.^{320, 449}

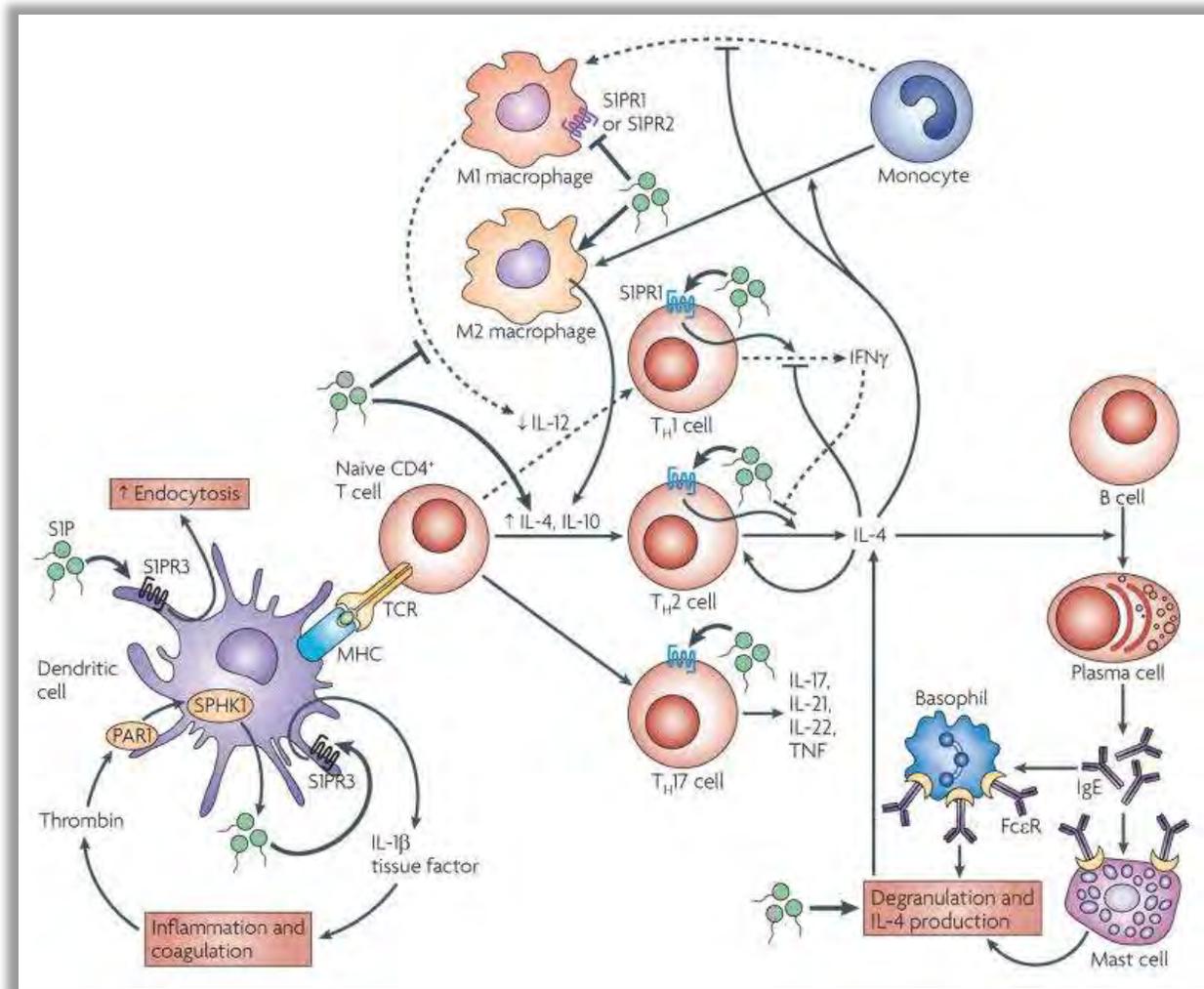


Figure 25: Effets de la S1P sur les fonctions des cellules immunitaires.⁷⁰⁰ La S1P promeut l'activation des lymphocytes Th2 et Th17 aux dépens des lymphocytes Th1 et ceci en augmentant la sécrétion des cytokines IL-4 et IL-10 et en inhibant la sécrétion de l'IL-12 par les cellules dendritiques. L'IL-4 augmente la sécrétion d'IgE par les lymphocytes B et induit l'expression des récepteurs correspondants (Fc ϵ R) sur les mastocytes, déclenchant ainsi les fonctions effectrices de ces cellules. L'IL-4, induite par la S1P, augmente également le ratio des macrophages M2/M1 modulant ainsi la réponse immune. Durant le choc septique, la stimulation de PAR1 par des protéases comme la thrombine induit l'activation autocrine du S1P3 par la S1P produite par les cellules dendritiques, ce qui aboutit à la sécrétion d'IL-1 β et du facteur tissulaire par ces cellules amplifiant ainsi l'inflammation et la coagulation. L'activation du S1P3 augmente d'autre part l'endocytose des DC matures.

Ainsi, après fixation au S1P1, la S1P régule le recrutement, la prolifération des cellules T et la réponse des cellules Th1. De plus, en présence de certaines cytokines, ce récepteur pourrait médier la réponse des lymphocytes Th2 et Th17 et modifier ainsi la réponse immunitaire.⁷⁰⁰

4.6- S1P et réseau de cytokines

Les cytokines, des régulateurs humoraux des réponses immunes innées et adaptatives, sont produites par les cellules du système immunitaire et de nombreux autres types cellulaires en réponse aux stimuli inflammatoires. Elles sont généralement classées en pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, IFN- γ) ou anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β). Toutefois, certaines cytokines, telles qu'IL-6 et le TGF- β peuvent disposer des deux fonctions de façon dépendante du contexte.⁵⁶¹

Les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-6 ainsi que les facteurs de transcription en aval, NF- κ B et STAT3, sont apparus comme les régulateurs critiques reliant l'inflammation et le cancer. Des travaux récents ont montré que la régulation positive de l'expression de la SK1, la formation de la S1P ainsi que l'activation subséquente du récepteur S1P1 joue un rôle essentiel dans le maintien de l'activation persistante de ces facteurs de transcription. Ce phénomène conduit à une inflammation chronique et au développement du cancer associé à la colite (CAC). Le FTY720 bloque la cascade d'amplification établie entre le S1P1 et la voie NF- κ B/IL-6/STAT3 ainsi que le développement du CAC. Ceci suggère que le FTY720 pourrait être envisagé pour le traitement du cancer chez les personnes présentant une inflammation chronique.⁴⁴⁸

De même, il a été rapporté que l'activation du S1P1 renforce l'expression de STAT3 et de l'IL6, accélérant ainsi la croissance tumorale et le développement métastatique. À l'inverse, le knock-down du S1P1 dans les cellules tumorales MB49 ou dans les cellules immunitaires des tumeurs B16 implantées chez la souris inhibe l'activité de STAT3 dans la tumeur ainsi que la croissance tumorale et la formation de métastases.⁴³¹

Ces données montrent le rôle de l'axe S1P/S1P1 dans la modulation cytokinique du microenvironnement tumoral, et dans l'inflammation associée au cancer.

4.6.1- TNF- α

Cette cytokine pléiotrope a été initialement décrite pour son activité anti-tumorale, puis pour son activité inflammatoire locale et systémique. TNF- α exerce ses fonctions par sa liaison aux récepteurs membranaires TNFR1 et TNFR2. TNFR1 s'est avéré le récepteur responsable de l'activité cytolytique de TNF- α , alors que TNFR2 médie les signaux de régulation de la prolifération.⁴⁶⁶ L'activation du TNFR1 déclenche l'apoptose et active les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 via TRAF2 / 5 et RIP1, conduisant à l'expression de multiples cytokines inflammatoires et molécules d'adhésion.¹¹¹

La capacité du TNF- α à induire l'activation de la SK1 et la formation de la S1P a été documentée dans divers types de cellules immunocompétentes, y compris les cellules endothéliales, les macrophages, les lymphocytes et les neutrophiles.^{477, 912, 917, 940} La SK1 semble réguler la signalisation du TNF- α par la liaison de la S1P à TRAF2 conduisant à l'activation de NF- κ B et à la survie cellulaire.¹⁵ A son tour, TRAF2 est essentiel à l'activation de la SK1 médiée par la phosphorylation d'ERK1/2; ceci montre la complexité du signal SK1/TRAF2.^{647, 911}

Le blocage de l'axe SK1/S1P par des moyens génétiques ou des inhibiteurs pharmacologiques inhibe la production d'anions superoxydes induite par TNF- α , l'expression de COX-2 et PGE2, ainsi que la production de cytokines / chimiokines, telles que l'IL6, CCL5 et CCL2.^{50, 642, 909}

4.6.2- TGF- β

Le TGF- β est une cytokine régulatrice ayant des effets pléiotropiques sur divers processus biologiques, y compris le développement, la régénération, la carcinogenèse, et les réponses immunitaires. Le TGF- β se lie à son récepteur TGF- β RII, qui active à son tour TGF- β RI. Le complexe activé de ces récepteurs conduit à l'activation et la translocation nucléaire de molécules SMAD, qui coopèrent avec d'autres facteurs de transcription résultant dans la régulation transcriptionnelle de gènes cibles.^{507, 676}

Le TGF- β a été reconnu pour son rôle central dans le système immunitaire, notamment dans le maintien de la tolérance périphérique en inhibant la prolifération et la différenciation de cellules T autoréactives. Cette cytokine contrôle aussi l'initiation et la résolution des réponses

inflammatoires en régulant la survie, la différenciation, l'activation et le chimiotactisme des cellules immunitaires. Les effets multiples du TGF- β sont spécifiques du type cellulaire et dépendent des voies de signalisation déclenchées par le complexe TGF- β / TGF- β R.^{447, 676}

Par exemple, le TGF- β exerce des effets anti-inflammatoires puissants sur l'endothélium en inhibant l'activité SK induite par TNF- α dans les cellules endothéliales, et en bloquant l'adhérence et la migration ultérieure des neutrophiles.²²³ A l'inverse, dans différents types de fibroblastes, le TGF- β exerce des activités proinflammatoires et mitogéniques, qui favorisent la fibrose.⁶⁷⁶ Plusieurs études ont montré qu'il existait une association entre les effets proinflammatoires du TGF- β et l'activation de la SK1 ou la liaison de la S1P à ses récepteurs.⁹⁰⁹

La signalisation de la S1P a été également impliquée dans le comportement invasif des cellules cancéreuses oesophagiennes induit par le TGF- β ,⁵²⁶ l'activité anti-apoptotique des mésoangioblastes,¹⁵² et la transdifférenciation des myoblastes en myofibroblastes.¹⁰⁰ La S1P régule aussi la transcription du TGF- β dépendante de l'inhibiteur de métalloprotéinase-1.⁹¹⁹ Elle est également médiatrice du remodelage de la matrice extracellulaire, de la croissance du tissu conjonctif, ainsi que de la production de collagène.⁹¹⁶ La S1P peut aussi activer les différentes protéines SMAD de la signalisation TGF- β pour médier les effets anti-inflammatoires de cette cytokine; ces effets ont été inhibés par le blocage des S1PRs.^{909, 916}

5- S1P et cancer (Figure 26)

5.1- Transformation oncogénique et croissance tumorale

L'activation de la SK1 contribue à la progression du cancer en induisant la transformation oncogénique, la croissance tumorale, et la résistance à l'apoptose.^{13, 627, 628} Une surexpression de la SK1 a été détectée dans plusieurs tumeurs humaines y compris le mélanome et a été parfois associée à un mauvais pronostic.^{10, 13, 856}

La SK1 contribue à la pathogénèse du cancer en activant certaines voies de signalisation telles que PI3K / Akt,⁷⁹³ MAPK,⁸¹⁷ NF- κ B,⁵⁰ et HIF1- α ,⁴ conduisant ainsi à une prolifération cellulaire incontrôlée. La SK1 peut également protéger les cellules tumorales contre l'apoptose induite par

divers facteurs tels que TNF- α et Fas L. La régulation négative de la SK1 par des siRNA dans des lignées de mélanome diminue les taux de la S1P ainsi que la résistance de ces cellules à l'apoptose médiée par le céramide.^{39, 563} Dans les cellules cancéreuses, la SK1 médie la survie dans des conditions de stress comme la privation de nutriments.¹³ De plus, la S1P renforce la progression, la néovascularisation, l'invasion et le potentiel métastatique de la tumeur.⁸⁷²

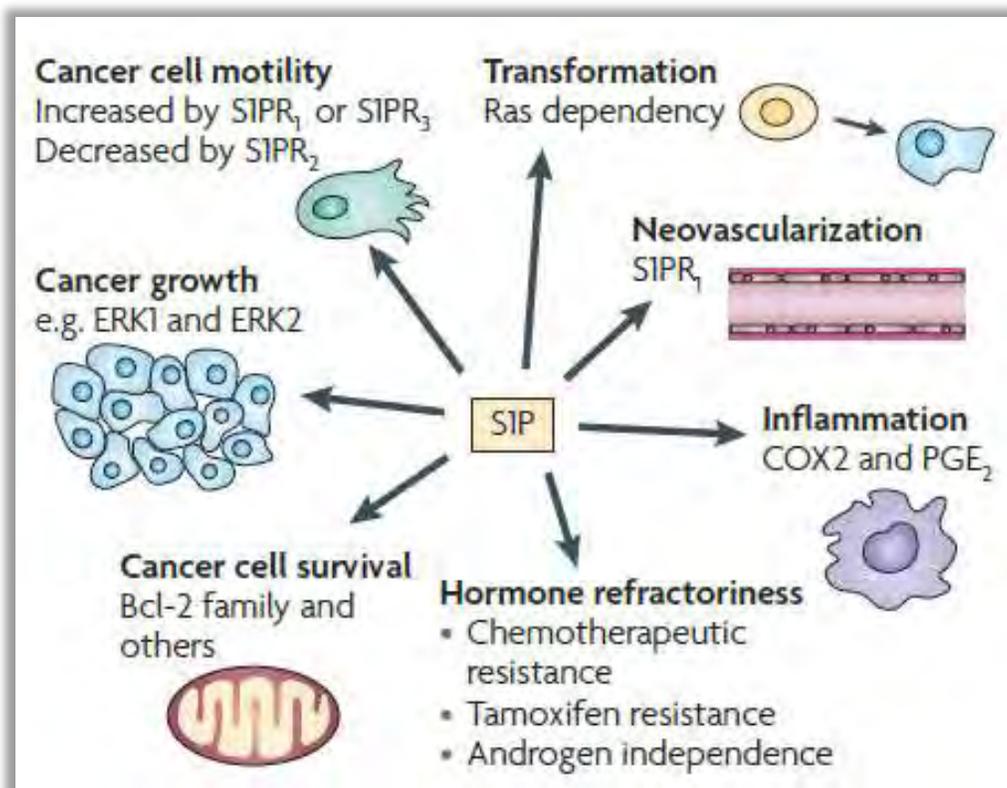


Figure 26: Résumé des actions de la S1P dans le cancer.⁶⁶⁶

5.2- Migration des cellules tumorales

La SK1 activée en aval de plusieurs récepteurs chimiotactiques (par exemple, LPA1, EGF, PDGF), induit la migration des cellules cancéreuses et augmente leur potentiel métastatique.^{302,}

⁷⁶⁶ La régulation à la hausse de l'activité de la SK1 augmente la migration cellulaire, alors que l'inhibition de la SK1 par des siRNA diminue la motilité cellulaire.^{151, 472} Le mécanisme proposé pour la migration cellulaire induite par la SK1 est la sécrétion de la S1P et son couplage aux S1PRs conduisant à l'activation de la signalisation Rac, la polymérisation de l'actine et la

formation des lamellipodes.³⁰¹ Les récepteurs S1P1, S1P3 et S1P4 induisent surtout des réponses pro-migratoires.^{255 479, 860} Tandis que les récepteurs S1P2 et S1P5 stimulent Rho et antagonisent Rac, conduisant à la formation des fibres de stress et l'inhibition de la migration.^{24, 572} Ainsi, l'effet de la S1P sur la motilité cellulaire dépend de l'expression différentielle des S1PRs sur un type cellulaire spécifique.

La S1P stimule la migration des cellules de fibrosarcome d'une manière dépendante de S1P1–RAC1–CDC42, et impliquant l'activation de la métalloprotéinase membranaire de type 1 (MT1-MMP ou MMP14).¹⁹⁶ L'invasion des cellules de cancer ovarien implique la signalisation via S1P1 ou S1P3 aboutissant à la mobilisation du calcium. 89. La S1P stimule également la migration des cellules tumorales gastriques qui expriment exclusivement S1P3 mais inhibe la motilité des autres cellules qui expriment majoritairement S1P2.⁹²⁰ De même, S1P2 contribue à l'inhibition de la migration des cellules de mélanome et des cellules de glioblastome en inhibant Rac et activant Rho.^{24 482}

Un autre mécanisme intracellulaire indépendant des S1PRs et participant à la migration des cellules tumorales a été décrit. En effet, Duan et ses collègues ont montré que la migration des cellules endothéliales induite par le facteur de croissance hépatocytaire implique la S1P intracellulaire mais pas les S1PRs.¹⁶¹ Une autre étude soutenant ce mécanisme a décrit la formation d'un complexe de signalisation entre SK1, S1P1, et les protéines du cytosquelette filamine A permettant ainsi le mouvement cellulaire.⁴⁷²

5.3- Angiogenèse tumorale

Plusieurs études suggèrent que l'axe SK1/S1P est impliqué dans l'angiogenèse tumorale. La S1P favorise la croissance des cellules endothéliales et interagit avec le VEGF qui est crucial pour l'angiogenèse.⁴⁶¹ Le VEGF stimule la production de la S1P dans la lignée cellulaire T24 de cancer de la vessie. La S1P induit à son tour l'activation de RAS et MAPK dans ces cellules d'une manière dépendante de VEGF.⁹⁰⁴

Il a été démontré que la S1P peut être sécrétée par le tissu tumoral vers les sites voisins, où elle aura accès au sang périphérique ou à la circulation lymphatique et agira comme un facteur chimiotactique pour attirer diverses cellules, y compris les cellules endothéliales vasculaires,

vers la niche tumorale.⁴⁵¹ L'expression du récepteur S1P1 est fortement induite dans les vaisseaux tumoraux, et le knock-down de ce récepteur diminue significativement l'angiogenèse et atténue la croissance tumorale dans des modèles murins.¹⁰² L'anticorps dirigé contre la S1P a montré une efficacité antitumorale,⁸⁷² notamment par l'inhibition de la prolifération cellulaire et de la libération de cytokines proangiogéniques telles que le VEGF, l'IL-8 et l'IL-6.⁸⁷²

5.4- Réponse inflammatoire

Comme déjà mentionné dans la partie 4.6 la voie SK1/S1P est impliquée dans l'induction de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α .⁹¹² À leur tour, les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 peuvent induire l'activation de la SK1 dans les cellules cancéreuses, via les voies de signalisation PI3K et MAPK.⁶²⁶

La S1P extracellulaire est capable d'induire la surexpression de COX2 et la production de PGE2 dans les cellules L929 de fibrosarcome et les cellules A549 d'adénocarcinome du poumon.⁶⁴² De même, la S1P sécrétée par les cellules tumorales apoptotiques est capable d'induire le recrutement vers le site tumoral et la polarisation des monocytes/ macrophages, et de promouvoir la stabilisation de l'ARNm de COX2 et l'expression de la protéine correspondante.^{265, 354, 890} À l'inverse, l'anticorps neutralisant la S1P inhibe l'invasion des macrophages dans les zones ischémiques.⁹¹⁴

5.5- Résistance aux chimiothérapies

La surexpression de la SK1 a été montrée pour inhiber l'apoptose induite par les chimiothérapies telles que les anthracyclines dans les cellules du cancer du sein MCF-7,⁵⁶³ la doxorubicine et l'étoposide dans les cellules leucémiques HL-60,⁵⁵ et la camptothécine et le docétaxel dans les cellules du cancer de la prostate PC3 et LNCaP.^{628, 738} Dans un modèle de leucémie myéloïde aiguë, l'activation soutenue de la SK1 a été associée avec une chimiorésistance.⁵⁵ Dans un modèle d'injection orthotopique, les cellules du cancer de la prostate PC3 surexprimant la SK1 ont démontré une résistance au traitement par le docétaxel.⁶²⁸

Plusieurs études ont montré que l'inhibition pharmacologique de la SK1 permettait la sensibilisation des cellules tumorales aux thérapies anticancéreuses. Dans diverses lignées cellulaires, l'inhibition de la SK1 ou le déplacement du rhéostat céramide/S1P en faveur du céramide augmente la réponse aux chimiothérapies^{55, 73, 118} ou à la radiothérapie.⁶²⁷ Le safinol, qui inhibe la SK1, administré indépendamment ou en association avec la doxorubicine réduit la croissance tumorale sans aucune toxicité apparente.⁷⁴⁷

6- Ciblage de la S1P

Il est devenu évident que la voie SK / S1P est impliquée dans des processus cellulaires multiples. Par conséquent, son ciblage s'avère utile pour le traitement de maladies diverses comme le cancer, les maladies inflammatoires et vasculaires.⁵⁹⁷

6.1- Agonistes et antagonistes des récepteurs à la S1P

6.1.1- FTY720 (Fingolimod, ou Gilenya™)

Le FTY720 (2-amino-2-[2-(4-octylphényl) éthyl] propane-1,3-diol) a été synthétisé pour la première fois en 1992 par modification structurelle de la myriocine, un métabolite fongique ayant des propriétés immunosuppressives isolé à partir d'une culture d'*Isaria sinclairii*. Le FTY720 est phosphorylé in vivo par la SK2, mais pas par la SK1, pour aboutir au FTY720-phosphate (FTY720-P), un analogue structural biologiquement actif de la S1P.^{374, 828, 934} Le FTY720 affecte la voie SK/S1P en agissant comme un inhibiteur compétitif de la sphingosine pour la liaison à la SK1 avec une K_i d'environ 2 μ M. Il induit par la suite la dégradation protéasomale de la variante d'épissage SK1a.⁴⁵⁴

Le FTY720-P se lie à tous les récepteurs connus de la S1P, sauf le S1P2. Bien qu'il soit un agoniste du récepteur S1P1, le FTY720-P induit l'internalisation et la dégradation de ce récepteur qui se traduit par la régulation négative prolongée de ce dernier, privant ainsi les lymphocytes du signal de la S1P nécessaire pour leur sortie à partir de tissus lymphoïdes secondaires. La majorité

des lymphocytes circulants sont ainsi séquestrés dans les ganglions lymphatiques, ce qui réduit le nombre des lymphocytes périphériques circulants.^{70, 254, 486, 508} (Figure 27)

Les sous-types de lymphocytes CD3⁺ (cellules T), CD4⁺ (cellules T auxiliaires), CD8⁺ (cellules T cytotoxiques), CD45RA⁺ (cellules T naïves) et CD45R0⁺ (Cellules T mémoires) sont réduits par le FTY720, tandis que le nombre de granulocytes, monocytes, éosinophiles, érythrocytes et plaquettes du sang périphérique reste inchangé. Le nombre de lymphocytes T est plus affecté que celui des lymphocytes B, et le compte des cellules CD4⁺ est plus touché que celui des cellules CD8⁺.⁸²⁸ Cette séquestration relativement concentrée sur les cellules CD4⁺ s'avère avantageuse dans le traitement de la sclérose en plaques (SEP) vu que ce type cellulaire est le contributeur majeur à sa physiopathologie. En effet, dans les modèles animaux de la SEP, le FTY720 empêche l'apparition de la maladie et réduit les lésions neurologiques établies.^{70, 210, 883}

Les résultats d'une étude clinique de phase 2, réalisée sur 281 patients randomisés pour recevoir le FTY720 par voie orale ou un placebo, ont montré que la rechute en présence du FTY720 était significativement plus faible que celle rapportée dans le groupe témoin. Ces résultats sont prometteurs quant au traitement des patients de la SEP par le FTY720. Les effets secondaires de ce traitement se traduisent par une bradycardie, une rhinopharyngite, une dyspnée, des maux de tête, de la diarrhée et des nausées.³⁶⁵

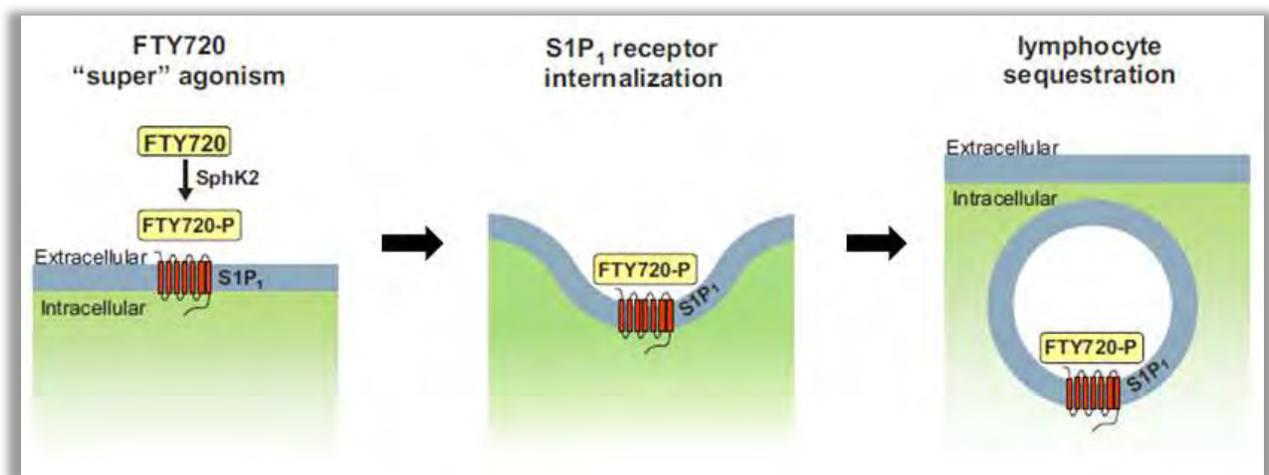


Figure 27: Internalisation du récepteur S1P₁ après phosphorylation du FTY720 par la SK2.⁸²⁸

6.1.2- *KRP-203*

KRP-203 est un agoniste sélectif du récepteur S1P1 connu pour son effet immunosuppresseur, il module à la fois les réponses des lymphocytes B et T. KRP-203 prolonge la survie du greffon et atténue le rejet chronique d'allogreffes cardiaques chez le rat.⁷⁶⁷ Cet agoniste sélectif du S1P1 inhibe également l'entérocolite dans un modèle de souris déficient en IL-10. Il inhibe la libération des cytokines pro-inflammatoires de type Th1 dans la lamina propria de l'intestin, et permet de séquestrer les lymphocytes dans les plaques de Peyer et les ganglions lymphatiques mésentériques entraînant la réduction des cellules T CD4⁺ sur le site inflammatoire.⁷⁹²

L'utilisation de KRP-203 avec sa sélectivité apparente pour le S1P1 permettrait d'éviter la bradycardie indésirable induite par le FTY720 qui affecte les récepteurs S1P3 cardiaques. Ainsi, KRP-203 pourrait être utile dans le traitement à long terme du rejet de greffes, et des maladies inflammatoires et auto-immunes.^{767, 828}

6.1.3- *SEW 2871*

L'agoniste SEW2871 du récepteur S1P1 est capable d'induire une lymphopénie chez la souris par un mécanisme dépendant du S1P1. Bien qu'il soit un agoniste sélectif du S1P1, il est structurellement différent de la S1P et sa phosphorylation n'est pas nécessaire pour la liaison au récepteur. SEW2871, comme la S1P, induit l'internalisation et le recyclage du S1P1, à la différence de FTY720-P, qui médie son internalisation et dégradation. Malgré son équivalence mécanistique à la S1P, SEW2871 semble moins efficace quant à l'activation d'ERK, de la migration cellulaire et du flux de calcium.³⁵¹ Il protège les reins contre les lésions ischémiques chez les animaux, préserve la fonction rénale, réduit l'infiltration des neutrophiles et des macrophages, et diminue la sévérité de la nécrose tubulaire aiguë.^{29, 453}

6.1.4- *JTE 013*

JTE 013, un antagoniste du récepteur S1P2, inhibe la liaison spécifique de la S1P au récepteur S1P2 mais pas aux récepteurs S1P1 ou S1P3.⁵⁸⁶ L'injection de la S1P chez les souris diabétiques a accéléré significativement la guérison de la plaie cutanée renforcée par le JTE-013, ce qui

montre leur antagonisme.³⁷⁰ Cependant, certaines études suggèrent que les effets inhibiteurs de JTE-013 pourraient être indépendants de l'antagonisme du récepteur S1P2, vu qu'il a affecté la contraction vasculaire des artères basilaires chez les souris knock-out pour ce récepteur.⁷²⁶

6.1.5- VPC 23019

VPC 23019 est un analogue de la S1P qui agit comme un antagoniste compétitif sélectif aux récepteurs S1P1 et S1P3. VPC23019 a été montré pour inhiber la migration induite par la S1P des cellules thyroïdiennes cancéreuses, des cellules cancéreuses de l'ovaire, et des cellules souches neurales.¹⁴⁰

6.2- Anticorps monoclonal anti-S1P

L'anticorps monoclonal spécifique dirigé contre la S1P (anti-S1P mAb; Sphingomab) permet la neutralisation moléculaire sélective de la S1P. L'effet de cet anticorps a été testé sur la tumorigenèse dans des modèles de xénogreffes et d'allogreffes chez la souris nude, et les résultats obtenus sont très prometteurs.⁸⁷²

L'anti-S1P réduit sensiblement la progression tumorale, et dans certains cas élimine les tumeurs mesurables. Il bloque la migration des cellules endothéliales et la formation de capillaires aboutissant à l'inhibition de la formation de vaisseaux sanguins induite par VEGF et PDGF.

Sphingomab neutralise également la prolifération induite par la S1P, diminue la libération de cytokines pro-angiogéniques, et bloque la capacité de la S1P à protéger les cellules tumorales de l'apoptose dans plusieurs lignées de cellules tumorales de carcinome du poumon humain (A549), d'adénocarcinome de sein humain (MCF-7, MDA MB-231 et MDA MB-468), et de carcinome ovarien humain (SKOV3).

Cette efficacité générale de l'anti-S1P sur l'inhibition de la croissance tumorale est probablement due à la prévention des effets pro-angiogéniques de ce lipide. Les essais cliniques avec une version humanisée de cet anticorps seront importants pour démontrer son efficacité thérapeutique chez l'homme.

6.3- *Inhibiteurs de la sphingosine kinase*

L'implication évidente de la SK1 dans la progression du cancer et la résistance a mis en avant son potentiel thérapeutique. Les dérivés de la sphingosine, la dihydrosphingospine (DHS) et la diméthylsphingosine (DMS), ont d'abord été utilisés pour déplacer le rhéostat céramide/S1P. Ces deux composés inhibent la croissance et provoquent l'apoptose dans un certain nombre de cellules tumorales, y compris la leucémie myéloïde aiguë, la leucémie myéloïde chronique, la leucémie lymphoblastique aiguë, le carcinome du col de l'utérus, l'adénocarcinome de la prostate, le cancer de l'estomac, le cancer du poumon, le cancer du côlon, le mélanome, le carcinome épidermoïde, l'hépatome, le neuroblastome, et l'adénocarcinome mammaire.

En particulier, la DMS inhibe de manière dose-dépendante la croissance *in vivo* du carcinome gastrique et du cancer de poumon dans les souris athymiques¹⁷⁵ Elle réduit considérablement les métastases pulmonaires des cellules du mélanome dans les souris syngéniques.⁵⁹⁰ La DMS a été le premier inhibiteur signalé pour le ciblage des sphingosines kinases 1 et 2 et l'induction de l'apoptose dans le cancer, mais pas dans les cellules normales.^{169, 820} Cette molécule manque cependant de spécificité vu qu'elle est également un inhibiteur de la protéine kinase C, de la phospholipase A2, et de la phospholipase D.⁵²¹ La L-thréo-dihydrosphingosine (Safingol) possède également des propriétés inhibitrices vis-à-vis des SK.³⁶

Des inhibiteurs plus spécifiques de SK, le F-12509a et B-5354c, ont été synthétisés à base des extraits du champignon marin *Trichopezizella barbata*. Comme la DMS, F-12509a semble inhiber la SK1 de manière compétitive, tandis que B-5345c a montré une inhibition non compétitive.³⁹² En particulier, contrairement aux DHS et DMS, ni F-12509a ni B-5354c ne semblent inhiber la PKC. F-12509a permet simultanément le blocage de la biosynthèse de la S1P et l'accumulation du céramide dans les cellules chimiosensitives HL-60 et les cellules chimiorésistantes HL-60/Doxo and HL-60/VP16, induisant ainsi l'apoptose de ces dernières.⁵⁵ Cet inhibiteur de la SK renforce également l'apoptose des cellules résistantes à l'imatinib en déplaçant le rhéostat céramide/S1P au profit du céramide.⁵⁶ L'administration de B-5354c déclenche l'apoptose dose-dépendante dans les cellules LnCaP et PC-3 du cancer de la prostate et cela peut être renversé par la régulation positive de la SK1.⁶²⁵

Un autre groupe d'inhibiteurs de la SK (SKI-I-V), qui possède également des propriétés anticancéreuses a été signalé par French et ses collègues en 2003, et a été confirmé par d'autres groupes.^{440, 628} Le SKI-II (2-(p-hydroxyanilo)-4-(p-chlorophényl) thiazole), présente une forte cytotoxicité envers le carcinome de la vessie T24 et les cellules MCF-7 et MCF-7/VP du cancer du sein.²⁰⁷ Il déplace la balance céramide/ S1P vers la production du céramide entraînant la mort des cellules LnCaP et PC-3 du cancer de la prostate indépendamment de leur statut de p53.⁶²⁸ SKI-II et V ont été testés chez la souris. L'administration intrapéritonéale de l'une ou de l'autre de ces molécules entraînait une diminution de la taille de la tumeur et une inhibition de la croissance tumorale de 50-80% avec aucune toxicité évidente.²⁰⁵

Récemment, un inhibiteur sélectif de la SK1 (SK1-I) ([2-(2-hydroxy-1-naphtyl) méthylène]-3-(2-naphtyl)-1H-pyrazole-5-carbohydrazide) a été décrit. Cette molécule induit l'apoptose des cellules leucémiques, mais non des cellules normales provenant de la moelle osseuse.⁶²¹ Xiang et ses collègues⁹¹³ ont développé des inhibiteurs (6ag, 9ab, and 12aa) de plus en plus spécifiques de la SK1 à travers une série de modifications de la sphingosine. Des recherches récentes sur la relation structure-activité de divers analogues de SK1-I ont permis le développement de nouveaux inhibiteurs avec optimisation de leur sélectivité et leur activité.²⁹³

De façon intéressante l'analogue de la sphingosine, FTY720, a également montré un effet inhibiteur envers la SK1 à la fois *in situ* et *in vitro*.^{627, 844, 867} Cet inhibiteur a été antérieurement montré pour induire l'apoptose médiée par la caspase-3 des cellules tumorales mais pas des cellules stromales du cancer de la prostate.^{637, 878} Dernièrement le (S)-FTY720 vinylphosphate⁸⁴⁴ et les sphingoguanidines (LCL146 et LCL351)⁷⁵⁸ ont été capables d'inhiber la SK1 et de diminuer la migration des cellules du cancer de la prostate.

Un nouvel inhibiteur sélectif de la SK2 (ABC294640) a été identifié et a montré une activité antitumorale.²⁰⁶ Un des mécanismes proposés pour son activité anticancéreuse était l'autophagie.⁴⁰ Il aurait aussi des effets anti-œstrogéniques sur les cellules du cancer du sein,²² pourrait bloquer la chimiorésistance de ces cellules²¹ (Antoon et al., 2011) et diminuer l'incidence du cancer du côlon associé à la colite chez les souris.¹¹⁹ Ces données soulignent la possibilité du ciblage de la SK2 pour le traitement du cancer.

OBJECTIF GÉNÉRAL DE LA THÈSE

Le mélanome cutané, une tumeur maligne qui se développe à partir des mélanocytes de l'épiderme, détient le triste record du cancer avec un sombre pronostic quand les lésions sont disséminées ou inopérables. Malgré les innovations pharmacologiques récentes, le traitement du mélanome reste inefficace en raison de l'extrême résistance des cellules tumorales aux thérapies conventionnelles ou ciblées. Cette résistance est en partie due aux changements de la niche tumorale lors de la progression du cancer, notamment à l'échappement des cellules du mélanome à la réponse anti-tumorale, et à l'établissement d'un microenvironnement immunosuppresseur. Les cellules tumorales ainsi que les cellules stromales participent à l'immuno-subversion par l'intermédiaire de la sécrétion de différents facteurs solubles y compris les cytokines inflammatoires, immunosuppressives et d'autres facteurs modulateurs de la réponse immune. Ainsi, sous l'action de ces facteurs solubles, les cellules immunitaires infiltrant la tumeur acquièrent de nouveaux phénotypes inflammatoires ou immunosuppresseurs déviant en conséquence la réponse cytotoxique anti-tumorale et créant une tolérance immunitaire vis à vis du cancer.

Les sphingolipides sont des constituants abondants et essentiels de la peau. Certains métabolites comme le céramide et la S1P régulent également des fonctions cellulaires essentiellement au développement tumoral. Contrairement au céramide, la S1P agit comme un oncométabolite en induisant des effets prolifératifs, anti-apoptotiques, angiogéniques et invasifs. De nombreux travaux ont aussi montré que la S1P et ses récepteurs exerce un rôle majeur sur le trafic et la différenciation des leucocytes. Ainsi, étant donné que la production de S1P, dépendante de SK1, est augmentée dans les cellules de mélanome, l'hypothèse selon laquelle la S1P pourrait réguler la réponse immune antitumorale en agissant sur les populations leucocytaires infiltrant la tumeur a été posée.

Par conséquent, l'objectif général de mon projet de thèse était d'étudier le rôle de S1P/SK1 sur le recrutement et la différenciation des cellules immunitaires et en particulier des macrophages dans le mélanome. Deux parties ont été développées : 1- Étude du rôle de la SK1 du mélanome dans l'infiltrat immunitaire de la tumeur et la progression du cancer; 2- Étude de l'implication de la SK1 de l'hôte dans l'infiltrat immunitaire de la tumeur et la progression tumorale.

MATÉRIELS & MÉTHODES

I- Culture cellulaire et production de milieux conditionnés

Les lignées cellulaires de mélanome ont été obtenues à l'ATCC et ont été cultivées sous forme de monocouches dans les milieux de culture RPMI ou DMEM (Gibco ®) supplémentés avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) inactivé par la chaleur, en présence de 5% de CO₂ dans une atmosphère humidifiée à 37°C. Les lignées de mélanome humain COLO829 et murin B16F10 ont été utilisées pour un nombre limité de passages et systématiquement testées pour l'expression de la protéine de la lignée mélanocytaire MelanA / MART1.

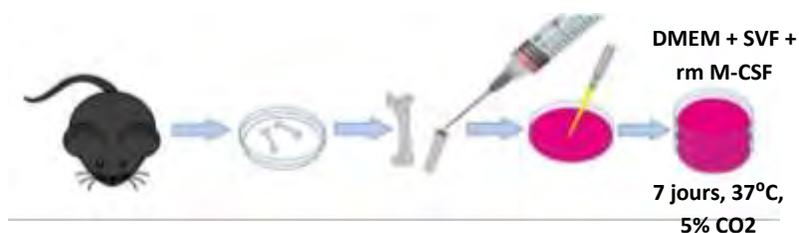
Les lignées monocytaires humaine THP-1 et murine RAW 264.7 ont été fournies respectivement par le Dr A. Coste (Université de Toulouse, France) et le Dr I. Maridonneau-Parini (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France). Ces lignées ont été cultivées dans du RPMI supplémenté par 10% de SVF (et 0,05 mM β-mercaptoéthanol pour la ligné THP-1). Les cellules THP-1 ont été différenciées en macrophages par stimulation avec 60 nM de phorbol myristate acétate (PMA de chez Sigma) pendant 12-16 heures; puis ces cellules ont été cultivées pendant 24 heures supplémentaires sans PMA.

Les milieux conditionnés ont été générés en cultivant les cellules de mélanome dans un milieu de culture exempt de sérum pendant 48 heures. Dans certaines expériences, les cellules de mélanome ont été traitées avec 3 μM d'inhibiteur de la sphingosine kinase, SKI-I (5- (2-Naphthalényl) -1*H*- pyrazole -3- acide carboxylique 2- [(2-hydroxy-1 naphthalényl) méthylène] hydrazide), fourni par Abcam.

A la fin de la période de culture, les surnageants ont été recueillis, centrifugés pendant 5 min à 1500 rpm et filtrés à travers des filtres de 0.22μm. Les macrophages ont été ensuite traités par le surnageant (milieu conditionné) seul ou en présence de 50 ng/ml de TGF-β1 recombinant (eBioscience SAS, Paris, France) ou 1 μg/ml d'anticorps anti-TGF-β1 (Clone #1D11, R&D systems, Lille, France) pendant 48 heures.

II- Isolement et culture de macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris (BMDM)

Les cellules de la moelle osseuse ont été isolées à partir des fémurs et tibias de souris C57BL/6 âgées de 12 semaines en moyenne. Ces cellules ont été cultivées et différenciées en macrophages (BMDM) en présence de RPMI 10% SVF, et de 20 ng/ml de la protéine recombinante murine M-CSF (Immunotools) dans des boîtes de pétri de 100 mm de diamètre conçues pour minimiser l'adhérence des BMDM (VWR®). Au bout de 7 jours, les macrophages adhérents ont été récoltés, comptés et incubés ou non avec les milieux conditionnés de cellules de mélanome.



III- Transfection cellulaire

Les cellules de mélanome murin B16F10 ont été co-transfectées avec 0.5 µg du plasmide pEGFP-C1 codant pour la protéine fluorescente GFP et 5µg du plasmide pLKO.1 vide (shCtrl, Addgene) ou contenant un shRNA dirigé contre la SK1 parmi 3 différents shRNA utilisés (shSK1, shSK1#2 et shSK1#3, ThermoScientific). Les cellules transfectées, en utilisant la Lipofectamine 2000 (Invitrogen), ont été ensuiteensemencées en raison de 500 000 cellules par flacon de culture cellulaire T25. Puis, ces cellules ont été sélectionnées avec 0,75 mg/ml de G418 (Sigma) et 2 µg/ml de puromycine (Invivogen). Les cellules exprimant la GFP ont été triées par cytométrie en flux. Les clones stables ont été maintenus dans des milieux contenant 1 µg/ml de puromycine. La sélection par la puromycine a été arrêtée quelques jours avant les manipulations expérimentales.

Les cellules de mélanome humain COLO829 ont été transfectées avec les plasmides pcDNA3.1 ou pcDNA3.1-SK1 (fournis par Dr. S.M. Pitson, Centre for Cancer Biology, Australie). Les cellules stablement transfectées ont été sélectionnées avec 0,75 mg/ml de G418.

IV- Essai de motilité in vitro

Les essais de migration cellulaire ont été effectués dans des chambres de Boyden constituées d'inserts perforés dont le diamètre des pores mesure 8 μm (Corning). Les macrophages (BMDM ou THP-1) ont été mis en suspension en raison d'un million de cellules/insert dans du DMEM dépourvu de sérum en présence ou non de 2 μM d'antagonistes de récepteurs à la S1P: VPC23019 (Coger, Paris, France) ou FTY720 (Sigma). Les inserts ont été placés dans des plaques 24 puits formant ainsi des chambres de migration. Le fond des chambres a été rempli de milieux conditionnés provenant des cellules de mélanome, ou de milieu sans sérum contenant ou non de la S1P (Biovalley, Nanterre, France) aux concentrations indiquées. Après le temps indiqué, les macrophages qui ont migré vers la face inférieure des membranes ont été récoltés et quantifiés en utilisant un compteur de cellules Coulter de chez Beckman.

V- RT-PCR quantitative

Les cellules non confluentes ont été récoltées et l'ARN a été extrait selon le protocole du fournisseur (kit RNeasy, Qiagen). L'ARN a été traité avec de la DNase dépourvue de RNase (Qiagen). La qualité d'ARN a été évaluée par électrophorèse automatique (Experion, BioRad), et sa concentration a été déterminée en utilisant un spectrophotomètre microvolume Xpose (Trinean). Un μg d'ARN a été rétro-transcrit sous l'action de l'enzyme RT SuperScript II (Invitrogen). L'ADNc généré a été dilué et 25 ng ont été utilisés comme matrice pour la PCR quantitative. Les réactions ont été réalisées en duplicat dans le thermocycleur StepOne (Applied Biosystems) en utilisant le QuantiFast SYBR Green Master Mix et les amorces QuantiTect (Qiagen). Les résultats ont été quantifiés en utilisant le logiciel du système StepOne software. Les ARNm 18S et β -actine ont été utilisés comme contrôles endogènes pour la normalisation de l'expression. Le taux de variation de l'expression du gène cible stimulé par rapport au témoin non stimulé a été déterminé selon la formule suivante: $\text{taux de variation} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, où $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{Cible}} - \text{Ct}_{\text{Contrôle}})_{\text{stimulé}} - (\text{Ct}_{\text{Cible}} - \text{Ct}_{\text{Contrôle}})_{\text{non stimulé}}$. Les valeurs de Ct ont été définies comme le numéro de cycle au cours duquel les signaux de fluorescence ont été détectés.

VI- Analyse des lipides par spectrométrie de masse

Les lipides ont été extraits à partir de tumeurs broyées dans du méthanol : eau/EgTA (2:1, v/v). La S1P a été dérivée par le (triméthylsilyl)diazométhane dans de l'hexane, puis dissoute dans du méthanol pour l'analyse. L'extraction du céramide a été réalisée dans une solution de méthanol (2% acide acétique) / CH₂Cl₂, puis le céramide extrait a été repris dans du méthanol pour l'analyse. La normalisation des échantillons a été réalisée par le moyen de standards internes SoP 20:1 (3.2 ng/ml) pour la S1P ou Cer d18:1/15:0 (1 ng/ml) pour les céramides. Les sphingolipides ont été quantifiés par Chromatographie liquide à ultra-performance, en utilisant un système Agilent 1290 Infinity UHPLC couplé à un spectromètre triple quadripôle de la série 6460 (Agilent Technologies).

VII- Mesure de l'activité enzymatique SK1

Les cellules ont été lavées avec du PBS froid, récoltées et sédimentées par centrifugation. Les culots cellulaires ont été resuspendus dans 100 µL de tampon de lyse (20 mM Tris, pH 7.4, 20% glycérol, 1 mM EDTA, 120 mM β-mercaptoéthanol, 40 mM β-glycérophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 15 mM NaF, 1 mM PMSF, 1% d'un mélange d'inhibiteurs de protéases, 0.5 mM 4-déoxyypyridoxine).

Après sonication, la concentration protéique a été déterminée par la méthode de Bradford. 100 µg de protéines ont été incubés avec 1 mM de D-érythrospingosine, 20 mM d'ATP et du [γ -³²P] ATP (10 µCi dissouts dans 200 mM de MgCl₂) dans 5% Triton X-100 pendant 30 min à 37°C dans un volume final de 200 µl. La réaction a été arrêtée par ajout de 20 µl de HCl 1N et 800 µl de chloroforme/méthanol/HCl (100:200:1, v/v). Après agitation, 250 µl de chloroforme et 250 µl de KCl 2 M ont été ajoutés, les phases ont ensuite été séparées par centrifugation. La phase organique a été évaporée et resuspendue dans un mélange chloroforme/méthanol (2:1, v/v).

Les lipides ont été séparés en chromatographie sur couche mince de silice (Whatman) par un mélange de 1- butanol/méthanol/acide acétique/eau (80:20:10:20, v/v). La S1P marquée a été visualisée en utilisant un PhosphorImager (Typhoon) et quantifiée avec le logiciel ImageQuant.

VIII- ELISA du TGF-β1

Les surnageants de culture de B16-F10 confluentes ont été récupérés après 48h dans du DMEM dépourvu de sérum. Les milieux récupérés ont été centrifugés et filtrés à l'aide de filtres de 0.22 µm, puis concentrés par centrifugation sur des colonnes Vivaspin 2, 5 KD, Polyéthersulfone (PES) (Sartorius, France). La concentration de TGF-β1 murin a été mesurée dans les échantillons en suivant les instructions du fabricant (Abcam) et normalisée par rapport aux taux des protéines cellulaires totales mesurés par Bradford.

IX- Bioinformatique

Les niveaux d'expression des ARNm de SK1 et TGF-β1 ont été évalués chez les patients de mélanome de la cohorte TCGA SKCM (n = 472). Les données de niveau 3 ont été interprétées à l'aide des estimations de transcription des gènes (<https://genome-cancer.ucsc.edu/>). La mesure de corrélation a été effectuée en utilisant le coefficient de la corrélation Pearson.

X- Greffes orthotopiques de mélanome chez la souris

Les expérimentations animales ont été menées en conformité avec les politiques nationales et internationales, et notre protocole a été approuvé par le Comité d'éthique de la région Midi-Pyrénées. Les cellules B16F10 shCtrl ou shSK1 (300000 cellules dans 100 µl de PBS) ont été injectées par voie intradermique dans le flanc de souris C57BL/6 âgées de 8 semaines (Charles River, L'Arbresle, France).

Pour la mesure du volume, les souris ont été endormies par l'isoflurane et les tumeurs ont été mesurées aux temps indiqués à l'aide d'un pied à coulisse. Les volumes ont été calculés en utilisant la formule: longueur x largeur² x 0.52, et ont été exprimés en mm³. Pour le poids, les souris ont été sacrifiées et les tumeurs ont été retirées 10 jours après l'injection et pesées sur une balance de précision. Le poids a été exprimé en mg.

XI- Analyse des leucocytes infiltrant les tumeurs

Les cellules B16F10 shCtrl ou shSK1 (300000 cellules dans 100 µl de PBS) ont été injectées par voie intradermique dans le flanc de souris C57BL/6 âgées de 8 semaines. Au jour 10, les souris ont été sacrifiées et les tumeurs ont été prélevées, dissociées et digérées à l'aide du kit MACS de séparation et le dissociateur gentleMACS™ en suivant le protocole du fournisseur Miltenyi Biotec.

Cette étape a été suivie par un enrichissement des leucocytes au Ficoll®. Les cellules ont été ensuite comptées, marquées avec les anticorps indiqués et le réactif Live-dead (Invitrogen) et analysées par cytométrie en flux (BD LSRFortessa) en utilisant le logiciel BD FACSDiva™.

Les anticorps murins utilisés ont été les suivants : anti-CD45 (BD Biosciences, BUV395), anti-CD11b (BD Biosciences, APC), anti-Gr1 (BioLegend, PE), anti-F4 / 80 (eBioscience, APC), anti- CMH-II (eBioscience, APC-E780), anti-CD206 (BioLegend, FITC), anti-iNOS (BioLegend, PE-Cy7), anti-Thy1 (BioLegend, APC-Cy7), anti- CD8 (BioLegend, BV605) ou anti-CD4 (eBioscience, PB-E450) .

XII- Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en tant que moyennes ± sem. Le test t de Student a été utilisé pour les comparaisons statistiques entre les groupes et les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque $p < 0,05$ (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). La corrélation de Pearson a été réalisée en utilisant GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

RÉSULTATS

I- Étude du rôle de la sphingosine kinase 1 du mélanome dans l'infiltrat immunitaire de la tumeur et la progression du cancer

1- Introduction

Une tumeur est une entité hétérogène regroupant des cellules tumorales et des cellules stromales participant à sa progression. Le mélanome, en particulier, est un cancer hautement résistant aux thérapies ciblant les cellules tumorales, ce qui attribue un rôle évident au microenvironnement tumoral, notamment à l'infiltrat immunitaire, dans la progression et la résistance thérapeutique.³¹³ (Figure 28)

Les cellules immunitaires de la niche tumorale conçues pour reconnaître et détruire les cellules cancéreuses, peuvent être modulées par ces dernières afin d'établir des conditions favorables à la croissance et la progression tumorale.²²⁰ Plusieurs cellules contribuent à ce phénomène d'échappement au système immunitaire. Dans le mélanome, les macrophages jouent un rôle prépondérant et ont été corrélés à un mauvais pronostic clinique.^{71, 346}

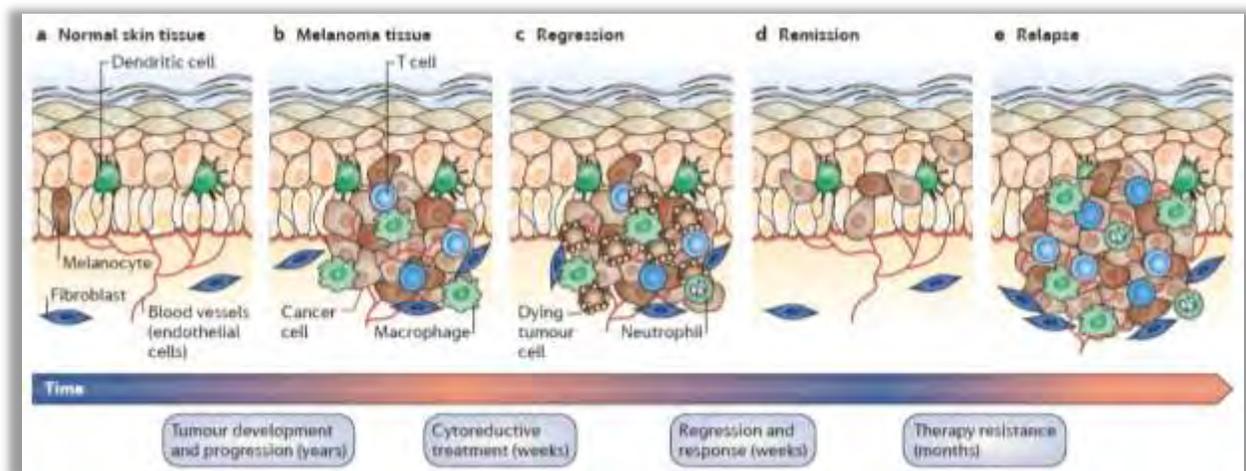


Figure 28: Evolution tumorale du mélanome et développement de la résistance aux thérapies.³¹³ a- Organisation stable des tissus cutanés, **b-** Mélanome *in situ* évoluant progressivement en métastase, **c-** Réponse immunitaire d'inflammation et de réparation suite à un traitement anti-tumoral, **d-** Rémission, **e-** Développement de la résistance à la thérapie et rechute.

Les macrophages dérivés de la lignée monocyttaire sont généralement recrutés à partir du sang vers le site tumoral via des molécules produites par les cellules stromales et malignes.⁶⁵¹ En réponse, aux stimuli du microenvironnement tumoral, les macrophages associés à la tumeur (TAM) subissent une polarisation métabolique et fonctionnelle en deux phénotypes distincts, soit en M1 (classiquement activé, pro-inflammatoire, anti-tumoral) ou en M2 (alternativement activé, anti-inflammatoire, protumoral).²¹⁶ Ce dernier est le phénotype majeur associé au cancer, il prédit un mauvais pronostic. Les TAM produisent une grande variété de facteurs de croissance, cytokines, chimiokines, protéines de la matrice extracellulaire, et protéases, qui favorisent l'angiogenèse, la croissance, et les métastases tumorales.^{623, 880} Ils induisent la suppression immunitaire en recrutant des cellules T régulatrices, qui s'opposent à l'action anti-tumorale des cellules effectrices telles que les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺.^{52, 495}

Il faut noter que le ciblage des macrophages augmente l'activité anti-tumorale des inhibiteurs de BRAF chez la souris et chez les tumeurs humaines de mélanome. Mais leur présence dans les tumeurs prédit une rechute précoce après le traitement, ce qui suggère des interactions importantes entre les TAM et les cellules malignes dans les tumeurs de mélanome.⁸⁷⁹ Cependant, les mécanismes sous-jacents de ces interactions sont peu compris.

De façon intéressante, nous avons récemment montré une augmentation de la production de la sphingosine 1-phosphate (S1P) dans des cellules de mélanome.^{10, 126} Ce métabolite sphingolipide bioactif est principalement produit par la sphingosine kinase SK1, qui est surexprimée dans les tumeurs de mélanome humain par rapport aux nævi.¹⁰ Dans de nombreux modèles de tumeurs, la S1P transmet des signaux oncogéniques via sa signalisation intracellulaire et / ou via ses récepteurs couplés aux protéines G (S1P1-5), exprimés à la fois sur les cellules cancéreuses et les cellules saines voisines.^{327, 474}

La production de la S1P par les cellules de mélanome affecte le microenvironnement tumoral en induisant une réponse fibroblastique qui stimule la migration des cellules de mélanome via S1P3.¹⁰ La S1P stimule également la vascularisation tumorale via S1P1.⁴¹¹ En outre, des études récentes démontrent que l'axe SK1 / S1P / S1PR joue un rôle essentiel dans le développement du cancer associé à l'inflammation.⁴⁰⁴ En effet, la régulation négative de la SK1 ou du récepteur S1P1 bloque l'activation persistante du facteur de transcription STAT3 et le niveau de cytokines pro-inflammatoires et réduit la progression du cancer dans des modèles murins

d'inflammation.^{145, 448} D'autre part, il a été montré que la polarisation des macrophages vers un phénotype M2, est médiée en partie par la S1P produite par les cellules du cancer du sein MCF-7. Cette S1P générée par les cellules tumorales en apoptose, favorise également la survie des macrophages.^{888, 890} La S1P promeut aussi l'activation des lymphocytes Th2 et Th17 aux dépens des lymphocytes Th1 et augmente la sécrétion des cytokines IL-4 et IL-10 tout en inhibant la sécrétion d'IL-12, favorisant ainsi la réponse humorale, inflammatoire et immunosuppressive sur la réponse cytotoxique.⁷⁰⁰ L'ensemble de ces données évoque le rôle de la S1P dans la plasticité des cellules immunitaires au sein du microenvironnement tumoral, et son importance dans la réponse immune anti-tumorale.

Par conséquent, l'objectif de cette étude était de déterminer si la S1P produite par la SK1 des cellules de mélanome pourrait contrôler l'inflammation dans ces tumeurs ainsi que la réponse immunitaire anti-tumorale. Nos résultats actuels fournissent de nouvelles perspectives sur le rôle de la SK1 dans le recrutement et la différenciation des macrophages, et dans la réponse immunitaire adaptative qui contrôlent la croissance du mélanome.

2- Résultats:

Article de recherche en révision dans Oncotarget

Downregulation of sphingosine kinase-1 induces protective tumor immunity by promoting M1 macrophage response in melanoma

Marguerite Mrad ^{1,2,3}, Caroline Imbert ^{1,2}, Virginie Garcia ^{1,2}, Florian Rambow ⁴, Nicole Therville ^{1,2}, Stéphane Carpentier ^{1,2}, Bruno Ségui ^{1,2}, Thierry Levade ^{1,2,5}, Rania Azar ³, Jean-Christophe Marine ⁴, Mona Diab-Assaf ³, Céline Colacios ^{1,2}, Nathalie Andrieu Abadie ^{1,2} *

¹Inserm UMR1037, Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer 2013, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, France; ²Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France; ³Molecular Tumorigenesis and Anticancer Pharmacology, EDST, Lebanese University, Hadath, Lebanon; ⁴VIB, Center for the Biology of Disease, 3000 Leuven, Belgium; ⁵Laboratoire de Biochimie Métabolique, CHU Toulouse, France

*Corresponding author: Nathalie Andrieu-Abadie, PhD; Inserm UMR1037 - Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Oncopôle de Toulouse, 2 avenue Hubert Curien, CS 53717, 31037 Toulouse cedex 1 France.

Phone: (33) 5 82 74 16 20

e-mail: nathalie.andrieu@inserm.fr

Keywords: inflammation, melanoma, macrophage, polarization, sphingosine 1-phosphate, TGF- β 1

Running title: The immune-related role of sphingosine kinase 1 in melanoma

Abstract

The infiltration of melanoma tumors by macrophages is often correlated with poor prognosis. However, the molecular signals that regulate the dialogue between malignant cells and the inflammatory microenvironment remain poorly understood. We previously showed that sphingosine kinase-1 (SK1), which produces the lipid mediator sphingosine 1-phosphate (S1P), is upregulated in melanoma. The present study aimed at defining the role of tumor SK1 in the recruitment and differentiation of macrophages in melanoma. Herein, we show that downregulation of SK1 in tumor cells results in impaired B16 murine melanoma growth in a syngeneic orthotopic graft mouse model. Importantly, this phenomenon is associated with a reduction in the percentage of CD206⁺ MHCII^{low} M2 macrophages in favor of an increase in the percentage of CD206⁺ MHCII^{high} M1 macrophages into the tumor. Moreover, downregulation of SK1 in melanoma cells causes an efficient differentiation of macrophages to an iNOS⁺/M1 phenotype that orchestrates T lymphocyte recruitment as well as tumor rejection through the expression of Th1 cytokines and chemokines. *In vitro* experiments indicated that macrophage migration is dependent on the binding of tumor S1P to S1PR1 receptors present on macrophages whereas macrophage differentiation is mediated by SK1-induced secretion of TGF- β 1. Finally, RNA-seq analysis of a collection of human melanoma tumors revealed a positive correlation between SK1 and TGF- β 1 expression. Altogether, our findings demonstrate that melanoma SK1 plays a key role in the recruitment and phenotypic shift of the tumor macrophages that promotes melanoma growth.

Introduction

Beside the cancer cells and their surrounding stroma, the tumor microenvironment contains innate and adaptive immune cells that can recognize and destroy tumor cells. However, mounting evidence indicates that tumor cells are able to change the functions of infiltrated immune cells to generate favorable conditions essential for tumor growth and progression [1].

In melanomas, macrophages represent a prominent component of the leukocytic infiltrate [2], and a high density of melanoma-associated macrophages correlates with poor clinical outcome [3]. Monocyte-derived macrophages are generally recruited from the blood to the tumor site by a wide array of biologically active molecules produced by malignant and stromal cells [4]. Infiltrating macrophages respond to this milieu and can polarize, similarly to the CD4⁺ Th1 versus Th2 cell paradigm, into either M1 (classically activated) or M2 (alternatively activated) macrophages according to environmental stimuli [5]. Tumor-associated macrophages (TAMs) are key orchestrators of cancer-related inflammation and are considered to be of the M2 phenotype. These cells produce a plethora of growth factors, cytokines, chemokines, extracellular matrix proteins, and proteases, which promote tumor angiogenesis, growth, metastasis, and immune suppression [6, 7]. Indeed, TAMs affect adaptive immune responses by recruiting T regulatory cells, which in turn suppress antitumor effector cells such as NK cells and CD8⁺ T cells [8, 9].

Of note, targeting macrophages increases the antitumor activity of BRAF inhibitors in mouse and human melanoma tumors. Conversely, the presence of macrophages in tumors predicts early relapse after treatment [10], suggesting important reciprocal interactions between TAMs and malignant cells in melanoma tumors. However, the possible underlying mechanisms of these interactions are not fully understood and their possible therapeutic ramifications await further investigation.

Interestingly, we recently showed an increased production of sphingosine 1-phosphate (S1P) in melanoma cells [11, 12]. This bioactive sphingolipid metabolite is mainly produced by sphingosine kinase SK1, which is overexpressed in human melanoma tumors compared to nevi [12]. In many tumor models, S1P conveys oncogenic signals as an intracellular second messenger and/or through a family of G-protein coupled receptors (S1PR1-5) expressed both on cancer cells and their surrounding microenvironment [13, 14]. In melanoma tumors, dysregulation of S1P production in cancer cells elicits a fibrotic response in the tumor microenvironment, which in turn stimulates melanoma cell migration by promoting S1PR3 expression [12]. Additionally, treatment of mice with the S1P receptor modulator FTY720, which renders cells unresponsive to S1P activation by sequestering S1PR1 intracellularly, reduced melanoma progression by inhibiting tumor vascularization [15]. These findings illustrate the paracrine action of melanoma cells-exported S1P through S1PRs on tumor-stroma interactions. However, recent studies demonstrate that the SK1/S1P/S1PR axis plays an essential role in inflammation-associated cancer development [16]. Indeed, RNAi-based downregulation of SK1 or S1PR1 has been shown to block the persistent activation of the STAT3 transcription factor and the level of proinflammatory cytokines and reduce cancer progression in mouse models of inflammation [17, 18].

Therefore, the goal of this study was to investigate whether S1P produced by melanoma cells could control inflammation in these tumors as well as the antitumor immune response. Our present findings provide new insights into the role of SK1 in the recruitment and differentiation of macrophages and the adaptative immune response to control melanoma growth.

Results

Downregulation of SK1 in melanoma cells reduces tumor growth and affects the composition of tumor-infiltrating leukocytes

In order to evaluate the effect of SK1 in a syngeneic mouse model of melanoma, we first generated stable SK1 knockdown clones of B16F10 cells, using shRNA-mediated silencing technology. As shown in Fig. 1A, two puromycin-resistant clones (shSK1 and shSK1#3) exhibited a markedly reduced mRNA expression as well as enzymatic activity of SK1, compared to B16 shCtrl. Importantly, all clones exhibited similar *in vitro* cell proliferation rates, irrespectively of SK1 mRNA level (data not shown). Then, B16F10 cells knockdown or not for SK1 were intradermally injected in C57BL6 mice, and tumor weight was evaluated 10 days later. Fig. 1B shows that, whereas the *in vivo* tumor growth of shSK1#2 B16F10 was not reduced compared to shCtrl B16F10, that of shSK1 and shSK1#3 B16F10 was significantly lower. The positive correlation found between SK1 activity and tumor weight highlights the tumor-promoting role of SK1 in melanoma.

A sphingolipidomic analysis showed that downregulation of SK1 in melanoma tumors significantly reduced the levels of S1P (Fig. 1C, left) but did not alter the total ceramide content (Fig. 1C, middle). However, the levels of C18:0 and C18:1 ceramide were modestly yet significantly increased (Fig. 1C, right). The alteration in S1P content was associated with a decrease in tumor volume and growth (Fig. 1D).

Then, to study whether and how the SK1/S1P/S1PR axis could control inflammation in melanoma tumors, the leukocyte content of tumors, in which SK1 was reduced, was analyzed by flow cytometry and compared to that of control tumors. On day 10 after B16F10 inoculation, downregulation of SK1 did not affect the percentage of CD45⁺ leukocytes among the total cells collected from dissociated tumors but led to a 40% decrease in F4/80⁺ cell infiltration compared to the control (Fig. 2A).

Moreover, the expression of cell surface markers such as the major histocompatibility complex class II (MHC-II) molecules, which are highly expressed on M1 macrophages, and the mannose receptor CD206, which is a specific marker of M2 macrophages, was investigated. As illustrated in Fig. 2B, downregulation of SK1 in B16 increased the percentage of M1-oriented MHC-II^{high}CD206⁻ TAMs (Fig. 2B, left). In accordance, the tumor content of inducible nitric oxide synthase (iNOS⁺) F4/80⁺ cells (Fig. 2B, right), which represent M1 macrophages, was higher in shSK1 B16 tumors

than in shCtrl B16 tumors. In contrast, the percentage of M2-oriented MHC-II^{low}CD206⁺ TAMs was decreased in melanoma tumors in which SK1 was inhibited (Fig. 2B, middle).

In addition, downregulation of SK1 in B16 led to an increased expression of Th1 cytokines (IL-12, TNF α , IFN γ) and chemokines (CCL5, CXCL9, CXCL10) into the tumor. In accordance, whereas mRNA expression of iNOS was significantly higher in shSK1 B16 tumors compared to that of shCtrl B16 tumors, the expression of the M2 markers YM1 and arginase-1 (ARG-1) was weakly affected (Fig. 2C).

Because M1 macrophages process tumor antigens and present them to T lymphocytes, which become activated, proliferate, and infiltrate the tumor [19], we next investigated the percentage of T lymphocytes in melanoma tumors. Interestingly, the proportion of different T-cell subpopulations (Thy1⁺) was altered in tumors in which SK1 was inhibited, with a significant increase of CD4⁺ and CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes (Fig. S1).

Collectively, our data indicate that melanoma SK1/S1P can control tumor growth by regulating the migration and polarization of macrophages.

Downregulation of SK1 in melanoma cells impairs the migration of bone marrow-derived macrophages via S1PRs

To explore the chemotactic behavior of macrophages in response to the melanoma SK/S1P/S1PR signaling pathway, bone marrow-derived macrophages (BMDM) were incubated with the conditioned medium (CM) from shCtrl or shSK1 B16 cells, and analyzed for their ability to migrate toward factors secreted by melanoma cells. Results show that the CM from shCtrl B16 cells exerted a powerful pro-migratory effect on BMDM as compared to BMDM incubated in medium alone. This effect was strongly attenuated when BMDM were exposed to the CM from shSK1 B16 cells (Fig. 3A, left). Since S1PR1, 2 and 3 are expressed by BMDM [20], we next examined whether S1PR1 and S1PR3, which are known to promote cell migration, are implicated in BMDM migration upon incubation with melanoma CM. Fig. 3A (right) shows that pretreatment of BMDM with VPC23019, a pharmacological antagonist of S1PR1/3 receptors, impaired the migratory effect exerted by the CM from tumor cells. Moreover, the direct treatment of BMDM with exogenous S1P mimicked, in a dose-dependent manner, the macrophage migration induced by the CM from melanoma cells. Again, pretreatment with VPC23019 abrogated S1P-induced BMDM migration (Fig. 3B).

To confirm that melanoma SK1 controls macrophage migration, we used the human melanoma cell line COLO829, which is devoid of SK1 protein [12], and generated the COLO829(SK1) variant, which exhibited a sharp increase in mRNA expression (Fig. 3C, left) as well as enzymatic activity (Fig. 3C, middle) of SK1. These modifications led to increased S1P levels in melanoma cells (Fig. 3C, right). Then, we analyzed the migration of the human monocytic cell line THP-1 upon incubation with the CM either from COLO829(SK1) or control COLO829. The results show that THP-1 cell migration was enhanced upon incubation with the medium from COLO829 cells, a phenomenon further augmented when melanoma cells overexpressed SK1 (Fig. 3D). Similar data were obtained for S1P-treated THP-1 cells (Fig. 3E, left). Pretreatment with VPC23019 abrogated the migratory effect exerted both by the CM and S1P (Fig. 3D and E, right). Similar results were obtained when using the S1PR1 modulator FTY720 instead of VPC23019.

Altogether, these results suggest that S1P produced by melanoma cells stimulates macrophage migration in a S1PR1-dependent manner.

Downregulation of SK1 in melanoma cells induces the expression of M1 markers in bone marrow-derived macrophages

Because an increased number of M1-oriented MHC-II^{high}CD206⁺ TAMs were present in shSK1 melanoma tumors (see Fig. 2B), we next studied the effect of SK1 inhibition on macrophage polarization *in vitro*. To this end, BMDM were incubated with the CM of B16 melanoma cells and the expression of M1 and M2 markers was analyzed. As shown in Fig. 4, whereas downregulation of SK1 in shSK1 B16 cells significantly increased the expression of INOS in BMDM, it also led to a strong decrease of ARG-1 expression. Moreover, the expression of Th1 cytokines and chemokines was increased in BMDM upon incubation with CM from shSK1 B16 cells as compared to those treated with CM from shCtrl B16 cells. Interestingly, for most M1 markers, treatment of melanoma cells with SK1-I, which inhibits SK1 enzymatic activity (Fig. 5B, left), further increased the mRNA expression induced by SK1 shRNA (Fig. 4A). These results demonstrate an inverse correlation between melanoma SK1 enzymatic activity and the expression of M1 markers in BMDM. Conversely, a positive correlation was found between SK1 activity and the expression of the M2 markers, CD206 and ARG-1 (Fig. 4A) but not for YM1 (data not shown).

To determine whether these effects could be related to S1P secretion from melanoma cells, BMDM were preincubated or not with VPC23019 before the addition of the CM from shCtrl B16 cells. Fig. 4B shows that the expression of M1 and M2 markers was not significantly modified by S1PR antagonism. Accordingly, direct treatment of BMDM with exogenous S1P did not induce any variations in macrophage differentiation as compared to BMDM incubated in medium without S1P (Fig. 4C).

Altogether, these findings indicate that macrophage polarization induced by melanoma SK1 occurs through a S1P/S1PR-independent way.

SK1-induced secretion of TGF- β 1 regulates macrophage polarization

To study further on the molecular mechanisms that control macrophage polarization, we analyzed an RNA-seq dataset obtained from a collection of 472 human cutaneous melanoma tissue samples (TCGA). We observed that the expression of the immunosuppressive cytokine TGF- β 1 was slightly, albeit significantly, lower in samples displaying a lower SPHK1 expression (Fig. 5A ; $p < 0.0001$), supporting a positive correlation between SPHK1 and TGF- β 1 expression in human melanoma tumors. Moreover, given that SK1 was reported to modulate the levels of TGF- β 1 in different inflammation-based experimental models [21, 22], we next explored whether the effects of melanoma SK1 on macrophage polarization could be mediated by TGF- β 1. Quantification of relative mRNA expression (Fig. 5B, middle) as well as ELISA performed on cell-free supernatants (Fig. 5B, right), revealed that downregulation of SK1 (Fig. 5B, left) is associated with a significant decrease in TGF- β 1 levels in melanoma cells, this phenomenon being amplified by SKI-I.

As most of the SK1/S1P-dependent immuno-modulatory effects are attributed to S1PR ligation, we next investigated the role of S1PRs in the regulation of SK1-induced TGF- β 1 gene expression. Fig. 5C shows that inhibition of S1PRs with three different antagonists, including the S1PR2-specific antagonist JTE013, or the direct treatment of B16F10 with exogenous S1P did not significantly change the TGF- β 1 transcript levels. These results suggest that SK1-induced TGF- β 1 gene expression is independent of the S1P/S1PR signaling pathways in melanoma cells.

Interestingly, addition of an anti-TGF- β neutralizing antibody to the CM shCtrl B16F10 increased the expression of M1 markers in BMDM (Fig. 5D). This effect mimicked the response observed in BMDM incubated with the CM from shSK1 B16F10

(Fig. 4A). Reciprocally, addition of a recombinant TGF- β 1 protein to the CM of shSK1 B16F10 rescued the ability of BMDM to polarize toward an M2 phenotype in response to melanoma cell signals. Moreover, under these conditions, the expression of M1 markers was reduced (Fig. 5E). These findings indicate that melanoma SK1 modulates macrophage differentiation through TGF- β 1 production.

Discussion

Inflammation has long been associated with the development of cancer. A common feature of melanoma is the infiltration of immature macrophages at early stages of tumorigenesis. These cells modulate the activity of T lymphocytes and stroma cells, either promoting or inhibiting tumor progression depending on TAM infiltration density and differentiation status [23]. Accordingly, it has been shown in different murine tumor models that either depletion of macrophages or switching the phenotype of these cells into tumor-fighting M1 macrophages can significantly halt tumor growth [24, 25].

Here, we report for the first time that SK1 regulates melanoma growth by modulating the macrophage infiltration of the tumor. Indeed, the percentage of F4/80⁺ macrophages was lower in tumors in which SK1 was silenced than in control tumors. In accordance, a large increase of SK1 protein is associated to an increased infiltration of macrophages into tumor tissues of *Sphk2*^{-/-} mice developing colitis-associated cancer. In the latter model, SK1 and S1PR1 stimulate tumor growth and drive TAMs and dendritic cells to produce elevated IL-6 levels, thereby promoting a pro-inflammatory tumor microenvironment [18]. These observations suggest that SK1 could be involved in the migration/trafficking of macrophages leading to their infiltration of tumors. *In vitro*, our findings demonstrate that S1P produced by melanoma SK1 acts as a potent chemoattractant for macrophages in a S1PR1-dependent manner. Indeed, treatment of BMDM with exogenous S1P promoted cell migration as previously reported for primary human macrophages [26]. Whether S1P produced by melanoma SK1 stimulates macrophage infiltration through activation of S1PR1 *in vivo* remains to be determined. Nevertheless, in different experimental mouse models of inflammation, FTY720 reduced macrophage recruitment to the sites of inflammation, demonstrating that S1PR1 can be critical for macrophage trafficking *in vivo* [27, 28]. In contrast, downregulation in cancer cells of the SK2 isoform, which differs from SK1 by its subcellular localization, failed to reduce the number of macrophages in breast tumors [29].

Our study also identified SK1 as a key regulator of macrophage polarization in melanoma tumors. Indeed, whereas knockdown of SK1 significantly increased the percentage of iNOS⁺MHC-II^{hi}CD206⁺ M1 macrophages into the tumor, it reduced the proportion of ARG⁺MHC-II^{low}CD206⁺ M2 macrophages. M1 macrophages are potent tumor-fighting cells and are able to suppress M2-associated tumor-promoting functions by a poorly understood mechanism [30]. Through the expression and secretion of cytokines and chemokines such as IL-12, CXCL9 and CXCL10, M1 macrophages drive the polarization and recruitment of Th1 cells. Reciprocally, by producing IFN γ , Th1 cells can drive classical M1 polarization of macrophages, thereby amplifying a type 1 response [31]. Our *in vitro* findings demonstrate that melanoma SK1 enzymatic activity correlates with a decrease of M1 markers, and conversely, an increase of M2 markers in BMDM. Previous reports have suggested that stimulation of S1PR1 by S1P reduces the expression of iNOS, TNF α , MCP-1 and IL-12, and induces ARG-1 expression in LPS-treated macrophages [32]. S1P-induced M2 polarization also occurs through IL-4 secretion in LPS-treated mouse peritoneal macrophages [33]. Here, we show that the phenotypic switch of macrophages induced by melanoma SK1 is not mediated by the binding of S1P to S1PRs on macrophages. Indeed, the expression of M1- and M2-specific markers was unaffected in macrophages pretreated with VPC23019 as compared to that of macrophages incubated with CM alone. Furthermore, addition of exogenous S1P to BMDM failed to promote macrophage polarization.

Our observations clearly show that melanoma SK1 regulates tumor-derived TGF- β 1 levels, which lead to the differentiation of macrophages poorly expressing M1 phenotype genes. Neutralization of TGF- β 1 in the CM from control melanoma cells stimulated M1 markers in BMDM. TGF- β 1 signaling has previously been reported to be activated by ligation of S1P to S1PR2 [34]. Here, we demonstrate that SK1-induced TGF- β 1 mRNA expression is not mediated by an autocrine S1P signaling loop through S1PRs. However, given that SK1 has been shown to activate transcription factors such as HIF-1 α [35] or NF- κ B [36] in various tumors and that TGF- β 1 expression is regulated by these factors [37, 38], one can speculate that SK1 regulates TGF- β 1 at a transcriptional level. However, this hypothesis still requires further investigation. Melanoma produces increasing amounts of TGF- β 1 with disease progression [39]. TGF- β 1 is one of the most potent immunosuppressive cytokine secreted by tumor cells. Notably, TGF- β 1 counteracts effector functions of macrophages, NK cells, cytotoxic T lymphocytes and dendritic cells as well as cytokine secretion [40]. On macrophages,

binding of TGF- β 1 to its receptor leads to activation and nuclear translocation of Smad molecules, which cooperate with other transcription factors to regulate gene expression and reprogramme macrophages to the M2 phenotype [41].

Finally, in a number of preclinical models, several TGF- β inhibitors, including small-molecule inhibitors targeting type I and II TGF- β receptor activity, monoclonal antibodies neutralizing TGF- β ligands and antisense oligonucleotides blocking TGF- β ligand production have demonstrated antitumor activity. For instance, in B16 murine melanoma, anti-TGF- β therapy in combination with interleukin-2 reduced the number of lung metastases [42]. In melanoma patients, the baseline serum TGF- β levels were significantly higher than those in the control group [43]. Recently, an antitumor activity has been described for fresolimumab, a human anti-TGF- β monoclonal neutralizing antibody, which was administered to patients with advanced malignant melanoma [44].

Collectively, our data identify a novel role for the S1P-producing enzyme SK1 as a key regulator of the balance between inflammatory and suppressive macrophages in melanoma tumors.

Materials and Methods

Cell culture and generation of conditioned medium

Melanoma cell lines were obtained from ATCC and grown as monolayers in RPMI or DMEM media supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) in the presence of 5% CO₂ in a humidified atmosphere at 37°C. B16F10 and COLO829 cell lines were used for a limited number of passages and routinely tested for the expression of melanocyte-lineage proteins such as MelanA/MART1. Human monocytic THP-1 cells obtained from Dr. A. Coste (University of Toulouse, France) were cultured in RPMI containing 10% FCS and 0.05 mM β -mercaptoethanol. THP-1 cells were differentiated into macrophages by stimulation with 60 nM PMA (Sigma) for 12-16 hours; then cells were cultured for an additional 24 hours without PMA.

Conditioned media (CM) were produced by culturing melanoma cells in serum-free RPMI for 48 hours. In some experiments, melanoma cells were treated with 3 μ M sphingosine kinase inhibitor SKI-1 (5-(2-Naphthalenyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxylic acid 2-[(2-hydroxy-1-naphthalenyl)methylene]hydrazide : Abcam). At the end of the culture period, the CM were collected, centrifuged for 5 min at 1500 rpm and filtered.

Macrophages were then treated with the CM alone or in the presence of 50 ng/ml recombinant TGF- β 1 (Ebioscience SAS, Paris, France) or 1 μ g/ml TGF- β 1 antibody (Clone #1D11, R&D systems, Lille, France) for 48 hours.

Isolation and culture of BMDM

Bone marrow cells were isolated from femurs and tibias of 12-week-old C57BL/6 mice and cultured (1.3×10^7 /dish, Bioscience Inc) in RPMI containing 10% FCS and 20 ng/ml recombinant murine macrophage colony-stimulating factor (rmM-CSF, Immunotools). After 7 days, adherent BMDM were harvested, counted and incubated or not with CM from melanoma cells.

Cell transfection

B16F10 cells were co-transfected, in a 1:10 ratio, with the pEGF-C1 empty vector plus one SK1 shRNA plasmid (shSK1 B16F10, 3 different shRNA from Thermoscientific were used) or a control (shCtrl B16F10) non-targeting shRNA plasmid (pLK01, Addgene). In brief, 500 000 cells were seeded in T25 cell culture flasks. The plasmids were diluted in OptiMEM (Thermofisher) medium without serum. Cells were transfected with 5 μ g shRNA oligomer using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Transfected cells were selected with 0.75 mg/ml G418 and 2 μ g/ml puromycin and GFP-expressing cells were sorted by FACS. Stable transfectants were maintained in media containing 1 μ g/ml puromycin; for the experiments, cells were cultured in medium without puromycin.

COLO829 were transfected with pcDNA3.1 or pcDNA3.1-SPHK1 plasmid (kindly obtained from Dr. SM. Pitson, Centre for Cancer Biology, Australia) and stable transfectants were selected for their resistance to 0.75 mg/ml G418 (Sigma).

***In vitro* motility assay**

Transmembrane cell migration assays were performed using Boyden chambers containing membranes with a pore size of 8 μ m (Corning). One million cells of BMDM or THP-1 cells were suspended in serum-free DMEM in the presence or absence of 2 μ M VPC23019 (Coger, Paris, France) or 2 μ M FTY720 (Sigma), and then added on top of the inserts. The bottom chamber was filled with CM from melanoma cells or serum-free medium either alone or containing S1P (Biovalley, Nanterre, France) at the

indicated concentrations. After the indicated time, macrophages that migrated to the underside of the insert membranes were harvested and quantified using a Coulter cell counter (Beckman).

Quantitative RT-PCR

Non-confluent cells were harvested and RNA was extracted (RNeasy kit, Qiagen) according to the manufacturer's protocol and treated with RNase-free DNase (Qiagen). RNA quality was assessed by automated gel electrophoresis (Experion, BioRad). One μ g of RNA was reverse transcribed (SuperScript II, Invitrogen) and the cDNA used as a template for qPCR. The reactions were performed in duplicate on the StepOne instrument (Applied Biosystems) using SYBR Green PCR kit and primer assay (QuantiTect, Qiagen). Results were quantified using the StepOne system software. mRNA of 18S and β -actin were analyzed for normalization.

Mass spectrometric analysis of lipids

Lipids were extracted from tumors and sphingolipids were quantified by ultra-performance liquid chromatography, using an Agilent 1290 UPLC system coupled to a G6460 triple quadrupole spectrometer (Agilent Technologies) [45].

SK1 enzymatic assay

SK1 activity was determined as described [46] with minor modifications.

ELISA for mouse TGF- β 1

Murine TGF β -1 from cell-free B16-F10 supernatants was measured by ELISA kit (Abcam) following the manufacturer's instructions.

Bioinformatics

SPHK1 and TGFB1 mRNA expression levels were assessed in melanoma patients of the TCGA SKCM cohort (n=472). Level 3 data was interpreted using gene transcription estimates as in RSEM normalized and centered log₂ counts (<https://genome-cancer.ucsc.edu/>). Expression levels were correlated using Pearson product-moment correlation.

Orthotopic melanoma grafts in mice

Animal experiments were conducted in accordance with national and international policies, and our protocol was approved by the Regional Ethics Committee of Midi-Pyrénées. shCtrl or shSK1 B16F10 cells (3.10^5) were intradermally injected into the flank of 8-week-old C57BL/6 mice (Charles River, L'Arbresle, France). Tumor volume was calculated using a caliper at the indicated days as described [12]. Alternatively, tumors were removed 10 days post-injection and weighed.

Analysis of leukocyte content in tumors

B16F10 cells (3.10^5) were intradermally injected into C57BL/6 mice. At day 10, mice were sacrificed and tumors were collected. Cells were counted and stained with the indicated antibodies and live-dead reactive dyes (Invitrogen) prior to flow cytometry analysis (BD LSRFortessa) [47]. Analyses were restricted to viable cells and performed using anti-mouse CD45 (BD Biosciences, BUV395), anti-F4/80 (eBioscience, APC), anti-mouse MHC-II (eBioscience, APC-e780), anti-mouse CD206 (Biolegend, FITC), anti-mouse iNOS (Biolegend, PE-Cy7), anti-mouse Thy1 (Biolegend, APC-Cy7), anti-mouse CD8 (Biolegend, BV605) or anti-mouse CD4 (eBioscience, eFluor 450). Isotype controls were from Biolegend or eBioscience.

Statistical analyses

Results are expressed as means \pm sem. Student's t test was used for statistical comparisons among groups and differences were considered statistically significant when $p < 0.05$ (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). Pearson correlation was performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

Financial support by INSERM, Paul Sabatier University, Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labellisée 2013) and the French and Lebanese ministries of foreign affairs (MAEDI) and Higher Education and Research (MENESR) (PHC CEDRE.

30750VL) is gratefully acknowledged. C.I is a recipient of a fellowship from Ligue Nationale Contre le Cancer. We thank the staff of the animal (Anexplo platform, Toulouse, France) and the flow cytometry (Inserm UMR1048 and UMR1037, Toulouse, France) facilities as well as the team of Dr. J. Maridonneau-Parini for technical assistance. We also acknowledge the assistance of Drs. A. Dupuy and J. Bertrand-Michel from the lipidomic facilities.

References

1. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. (2013) Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol* 14:1014-1022
2. Brocker EB, Zwadlo G, Holzmann B et al. (1988) Inflammatory cell infiltrates in human melanoma at different stages of tumor progression. *Int J Cancer* 41:562-567
3. Jensen TO, Schmidt H, Moller HJ et al. (2009) Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma. *J Clin Oncol* 27:3330-3337
4. Pollard JW. (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4:71-78
5. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. (2012) Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 12:253-268
6. Payne AS, Cornelius LA. (2002) The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis. *J Invest Dermatol* 118:915-922
7. Wang T, Ge Y, Xiao M et al. (2012) Melanoma-derived conditioned media efficiently induce the differentiation of monocytes to macrophages that display a highly invasive gene signature. *Pigment Cell Melanoma Res* 25:493-505
8. Mantovani A, Sozzani S, Locati M et al. (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23:549-555
9. Biswas SK, Mantovani A. (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 11:889-896
10. Wang T, Xiao M, Ge Y et al. (2015) BRAF Inhibition Stimulates Melanoma-Associated Macrophages to Drive Tumor Growth. *Clin Cancer Res* 21:1652-1664

11. Colie S, Van Veldhoven PP, Kedjouar B et al. (2009) Disruption of sphingosine 1-phosphate lyase confers resistance to chemotherapy and promotes oncogenesis through Bcl-2/Bcl-xL upregulation. *Cancer Res* 69:9346-9353
12. Albinet V, Bats ML, Huwiler A et al. (2014) Dual role of sphingosine kinase-1 in promoting the differentiation of dermal fibroblasts and the dissemination of melanoma cells. *Oncogene* 33:3364-3373
13. Huwiler A, Pfeilschifter J. (2008) New players on the center stage: sphingosine 1-phosphate and its receptors as drug targets. *Biochem Pharmacol* 75:1893-1900
14. Maceyka M, Harikumar KB, Milstien S et al. (2012) Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol* 22:50-60
15. LaMontagne K, Littlewood-Evans A, Schnell C et al. (2006) Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization. *Cancer Res* 66:221-231
16. Kunkel GT, Maceyka M, Milstien S et al. (2013) Targeting the sphingosine-1-phosphate axis in cancer, inflammation and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 12:688-702
17. Deng J, Liu Y, Lee H et al. (2012) S1PR1-STAT3 signaling is crucial for myeloid cell colonization at future metastatic sites. *Cancer Cell* 21:642-654
18. Liang J, Nagahashi M, Kim EY et al. (2013) Sphingosine-1-phosphate links persistent STAT3 activation, chronic intestinal inflammation, and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 23:107-120
19. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21:137-148
20. Yang L, Han Z, Tian L et al. (2015) Sphingosine 1-Phosphate Receptor 2 and 3 Mediate Bone Marrow-Derived Monocyte/Macrophage Motility in Cholestatic Liver Injury in Mice. *Sci Rep* 5:13423
21. Huang LS, Berdyshev E, Mathew B et al. (2013) Targeting sphingosine kinase 1 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Faseb J* 27:1749-1760
22. Sorrentino R, Bertolino A, Terlizzi M et al. (2015) B cell depletion increases sphingosine-1-phosphate-dependent airway inflammation in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 52:571-583
23. Hussein MR. (2006) Tumour-associated macrophages and melanoma tumorigenesis: integrating the complexity. *Int J Exp Pathol* 87:163-176
24. Colombo MP, Mantovani A. (2005) Targeting myelomonocytic cells to revert inflammation-dependent cancer promotion. *Cancer Res* 65:9113-9116

25. Zeisberger SM, Odermatt B, Marty C et al. (2006) Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *Br J Cancer* 95:272-281
26. Gude DR, Alvarez SE, Paugh SW et al. (2008) Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal. *Faseb J* 22:2629-2638
27. Theilmeyer G, Schmidt C, Herrmann J et al. (2006) High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor. *Circulation* 114:1403-1409
28. Zhang Z, Zhang ZY, Fauser U et al. (2008) FTY720 ameliorates experimental autoimmune neuritis by inhibition of lymphocyte and monocyte infiltration into peripheral nerves. *Exp Neurol* 210:681-690
29. Weigert A, Schiffmann S, Sekar D et al. (2009) Sphingosine kinase 2 deficient tumor xenografts show impaired growth and fail to polarize macrophages towards an anti-inflammatory phenotype. *Int J Cancer* 125:2114-2121
30. Murray PJ, Wynn TA. (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11:723-737
31. Mantovani A, Sica A, Sozzani S et al. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25:677-686
32. Hughes JE, Srinivasan S, Lynch KR et al. (2008) Sphingosine-1-phosphate induces an antiinflammatory phenotype in macrophages. *Circ Res* 102:950-958
33. Park SJ, Lee KP, Kang S et al. (2014) Sphingosine 1-phosphate induced anti-atherogenic and atheroprotective M2 macrophage polarization through IL-4. *Cell Signal* 26:2249-2258
34. Miller AV, Alvarez SE, Spiegel S et al. (2008) Sphingosine kinases and sphingosine-1-phosphate are critical for transforming growth factor beta-induced extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation and promotion of migration and invasion of esophageal cancer cells. *Mol Cell Biol* 28:4142-4151
35. Ader I, Brizuela L, Bouquerel P et al. (2008) Sphingosine kinase 1: a new modulator of hypoxia inducible factor 1alpha during hypoxia in human cancer cells. *Cancer Res* 68:8635-8642
36. Alvarez SE, Harikumar KB, Hait NC et al. (2010) Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature* 465:1084-1088

37. Lin W, Tsai WL, Shao RX et al. (2010) Hepatitis C virus regulates transforming growth factor beta1 production through the generation of reactive oxygen species in a nuclear factor kappaB-dependent manner. *Gastroenterology* 138:2509-2518, 2518 e2501
38. Hung SP, Yang MH, Tseng KF et al. (2013) Hypoxia-induced secretion of TGF-beta1 in mesenchymal stem cell promotes breast cancer cell progression. *Cell Transplant* 22:1869-1882
39. Busse A, Keilholz U. (2011) Role of TGF-beta in melanoma. *Curr Pharm Biotechnol* 12:2165-2175
40. Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. (2007) Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 13:5262-5270
41. Malyshev I, Malyshev Y. (2015) Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage "Switch" Phenotype. *Biomed Res Int* 2015:341308
42. Wojtowicz-Praga S, Verma UN, Wakefield L et al. (1996) Modulation of B16 melanoma growth and metastasis by anti-transforming growth factor beta antibody and interleukin-2. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19:169-175
43. Tas F, Karabulut S, Yasasever CT et al. (2014) Serum transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) levels have diagnostic, predictive, and possible prognostic roles in patients with melanoma. *Tumour Biol* 35:7233-7237
44. Morris JC, Tan AR, Olencki TE et al. (2014) Phase I study of GC1008 (fresolimumab): a human anti-transforming growth factor-beta (TGFbeta) monoclonal antibody in patients with advanced malignant melanoma or renal cell carcinoma. *PLoS One* 9:e90353
45. Sorli SC, Colie S, Albinet V et al. (2013) The nonlysosomal beta-glucosidase GBA2 promotes endoplasmic reticulum stress and impairs tumorigenicity of human melanoma cells. *FASEB J* 27:489-498
46. Lavieu G, Scarlatti F, Sala G et al. (2008) Sphingolipids in macroautophagy. *Methods Mol Biol* 445:159-173
47. Bertrand F, Rochotte J, Colacios C et al. (2015) Blocking Tumor Necrosis Factor alpha Enhances CD8 T-cell-Dependent Immunity in Experimental Melanoma. *Cancer Res* 75:2619-2628

Legends to the figures

Figure 1. SK1 expression in melanoma cells drives tumor development in mice.

A, SK1 mRNA level (left panel) and enzymatic activity (right panel) were measured in B16F10 cells stably transfected with a control (shCtrl) or SK1 targeted shRNA (shSK1, shSK1#2 or shSK1#3). Data are expressed as fold-change over shCtrl B16F10 cells and are means \pm sem of 3-5 independent experiments. **B**, B16F10 murine melanoma cells ($3 \cdot 10^5$) were injected in the dermis of C57BL/6 mice. After excision 10 days later, tumors were collected and weighed (left panel). Data are means \pm sem ($n = 4$ to 5 mice per group). The relationship between SK1 enzymatic activity and tumor weight was evaluated with a Pearson correlation analysis (right panel). **C**, Cellular lipids were extracted from shCtrl or shSK1 tumors and sphingolipid levels were quantified by LC/MS. Levels of S1P (left panel), total ceramide (middle panel) and individual ceramide species (right panel) were normalized to protein content. Results represent means \pm sem of 2 independent experiments. **D**, Tumor volume was determined at the indicated days in the mice that were implanted with shCtrl or shSK1 B16F10 cells, as described in B. Results are from 2 independent experiments performed with 7 mice per group. Values determined for individual tumors are depicted and horizontal lines correspond to means.

Figure 2. Expression of SK1 in melanoma cells alters the tumor infiltration and phenotype of macrophages.

shCtrl or shSK1 B16F10 murine melanoma cells were injected in C57BL/6 mice. Ten days after injection, mice were sacrificed, tumors were collected, and their leukocyte content was analyzed. Bars represent means \pm sem of 4 mice per group. Data are representative of two independent experiments. **A** and **B**, Cells were counted and the proportion of the indicated cell populations among total cells was determined by flow cytometry. **A**, Percentages of CD45 (top) and F4/80 (bottom) among total cells. **B**, top, representative density plots. Values indicate the percentages of MHC-II^{high} CD206⁻ (left panel), MHC-II^{low} CD206⁺ (middle panel) and iNOS⁺ (right panel) cells among the F4/80⁺ cells. **C**, Relative mRNA expression (fold induction relative to shCtrl) is depicted for M2 markers (YM1 and ARG-1) and M1 markers (IL12, TNF α , IFN γ , CCL5, CXCL9, CXCL10). NS: not significant.

Figure 3. Macrophage migration is modulated by melanoma-derived S1P.

Transwell migration assays were performed to evaluate migration of BMDM (**A** and **B**) or THP-1 cells (**D** and **E**). Data are expressed as percent increase or decrease over migration in serum-free medium, and are means \pm sem of 2-4 independent experiments. **A** and **B**, BMDM were pre-treated (+) or not (-) with 2 μ M VPC23019 (VPC) for 1 hour. Then, BMDM were incubated for 5 hours in serum-free medium alone (Medium), the conditioned medium (CM) from shCtrl or shSK1 B16F10 melanoma cells (**A**) or in serum-free medium containing S1P at the indicated concentrations (**B**). **C**, SK1 mRNA expression (left panel), enzymatic activity (middle panel) and intracellular S1P levels (right panel) were measured in COLO829 melanoma cells transfected either with an empty vector (Vector) or a plasmid encoding human SK1 (SK1). Data are means \pm sem of 3 independent experiments. **D** and **E**, THP-1 cells were pre-treated with 2 μ M VPC23019 or 2 μ M FTY720 (FTY) for 1 hour. Then, THP-1 cells were incubated for 6 hours in the CM from control (Vector) or SK1-overexpressing (SK1) COLO829 melanoma cells (**D**) or in serum-free medium containing S1P at the indicated concentrations (**E**).

Figure 4. Macrophage polarization is controlled by melanoma SK1 through a S1PR-independent mechanism

BMDM were incubated for 24 hours in the conditioned medium (CM) from B16F10 melanoma cells (**A** and **B**) or serum-free medium containing or not 1 μ M S1P (**C**). Relative mRNA expression is depicted for M2 markers (*Mrc1* (CD206), *Chi3l3* (YM1) and *Arg1*) and M1 markers (*iNos*, *Il12*, *Tnf α* , *Ifn γ* , *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*). Data are plotted against the SK1 activity in B16F10 melanoma cells. **A**, CM was prepared from shCtrl or shSK1 B16F10 melanoma cells treated or not with 3 μ M SKI-I for 48 hours. **B**, BMDM were pre-treated with 2 μ M VPC23019 before incubation with the CM from shCtrl B16F10 melanoma cells. Data are expressed as fold-increase over shCtrl B16F10 cells and are means \pm sem of 2-6 independent experiments. **C**, Data are expressed as fold-change over migration in serum-free medium, and are means \pm sem of 3-4 independent experiments.

Figure 5. Melanoma SK1-Induced TGF- β 1 regulates macrophage polarization.

A. Analysis of SPHK1 and TGF- β 1 expression in melanoma tumors was carried out using the TCGA database. **B.** SK1 enzymatic activity (left), TGF- β 1 mRNA expression (middle) and TGF- β 1 secreted protein level (right) were measured in shCtrl or shSK1 B16F10 melanoma cells treated or not with 3 μ M SKI-I for 48 hours. **C.** TGF- β 1 mRNA level was measured in shCtrl B16F10 melanoma cells pretreated or not with 2 μ M VPC23019, 2 μ M FTY720 or 10 μ M JTE013 and incubated with 1 μ M S1P for 24 hours. Data are expressed as fold-increase over shCtrl B16F10 cells and are means \pm sem of 3 independent experiments. **D** and **E.** BMDM were incubated for 48 hours in the conditioned medium (CM) from shCtrl B16F10 melanoma cells. Relative mRNA level is depicted for M2 markers (CD206, YM1 and ARG-1) and M1 markers (iNOS, IL12, TNF α , IFN γ , CCL5, CXCL9, CXCL10). **D.** Anti-TGF- β 1 (1 μ g/ml) was added to the CM from shCtrl B16F10 melanoma cells before incubation with BMDM. **E.** Recombinant murine TGF- β 1 (50 ng/ml) was added to the CM from shSK1 B16F10 melanoma cells before incubation with BMDM. Results represent means \pm sem of 2-3 independent experiments.

Figure S1. Downregulation of SK1 in melanoma cells increases the number of intratumoral T-lymphocytes

shCtrl or shSK1 B16F10 murine melanoma cells were injected in C57BL/6 mice. Ten days after injection, mice were sacrificed and tumors were collected. Then, cells were counted and the proportion of the indicated cell populations was determined by flow cytometry. Values indicate the percentages of Thy1⁺ (left panel), CD4⁺ (middle panel) and CD8⁺ (right panel) cells among total cells. Bars represent means \pm sem of 4 mice per group. Data are representative of two independent experiments.

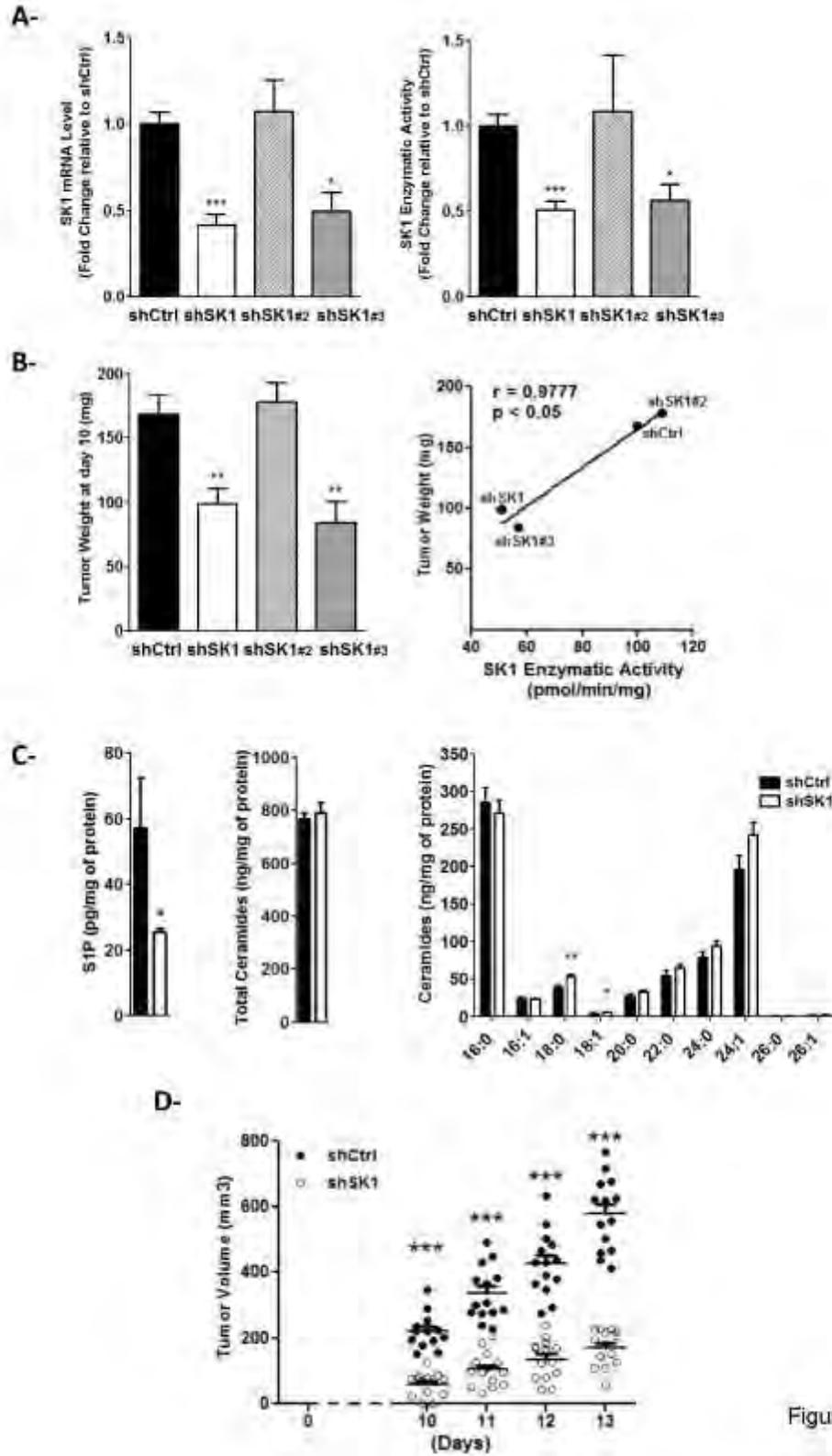


Figure 1

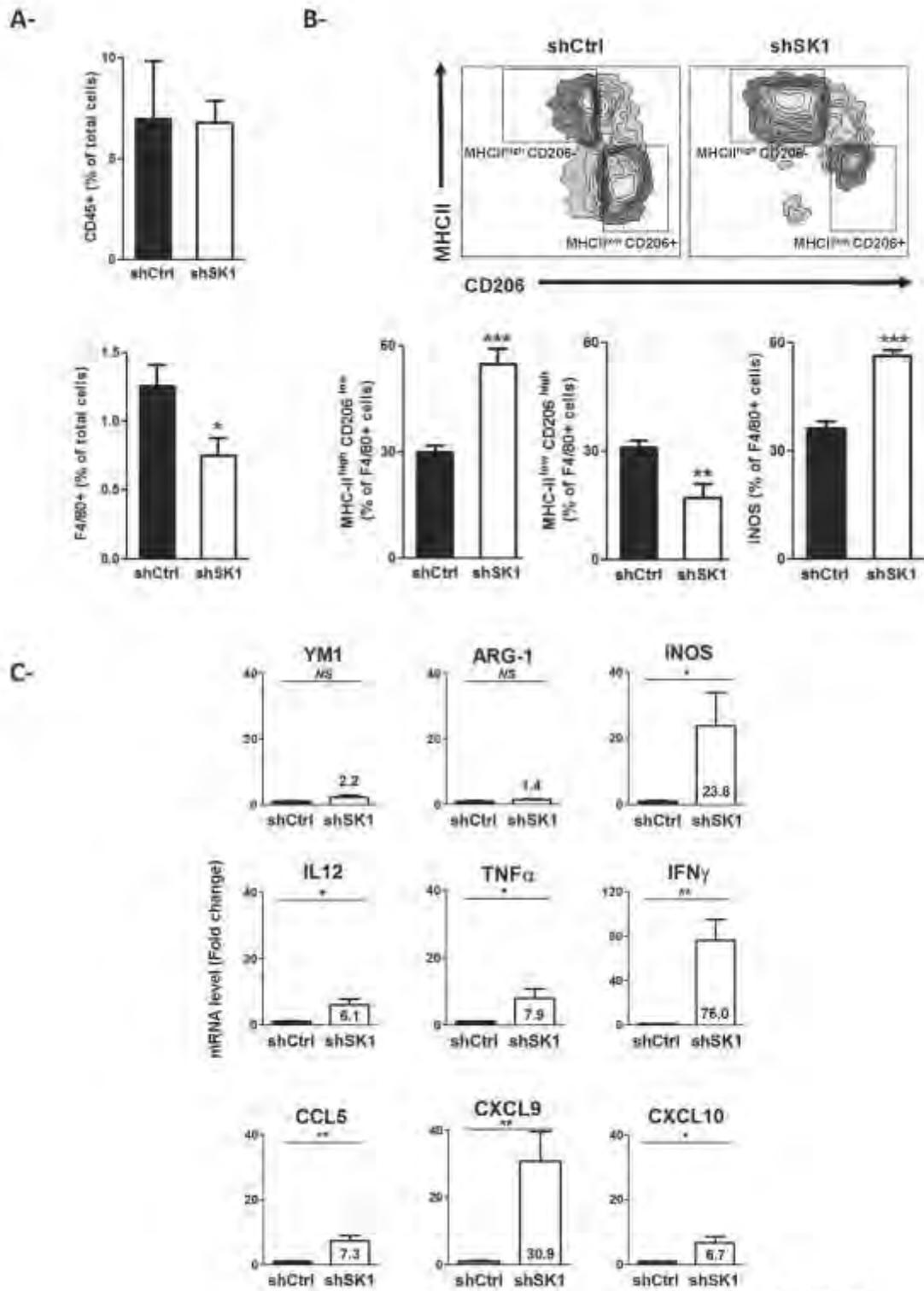


Figure 2

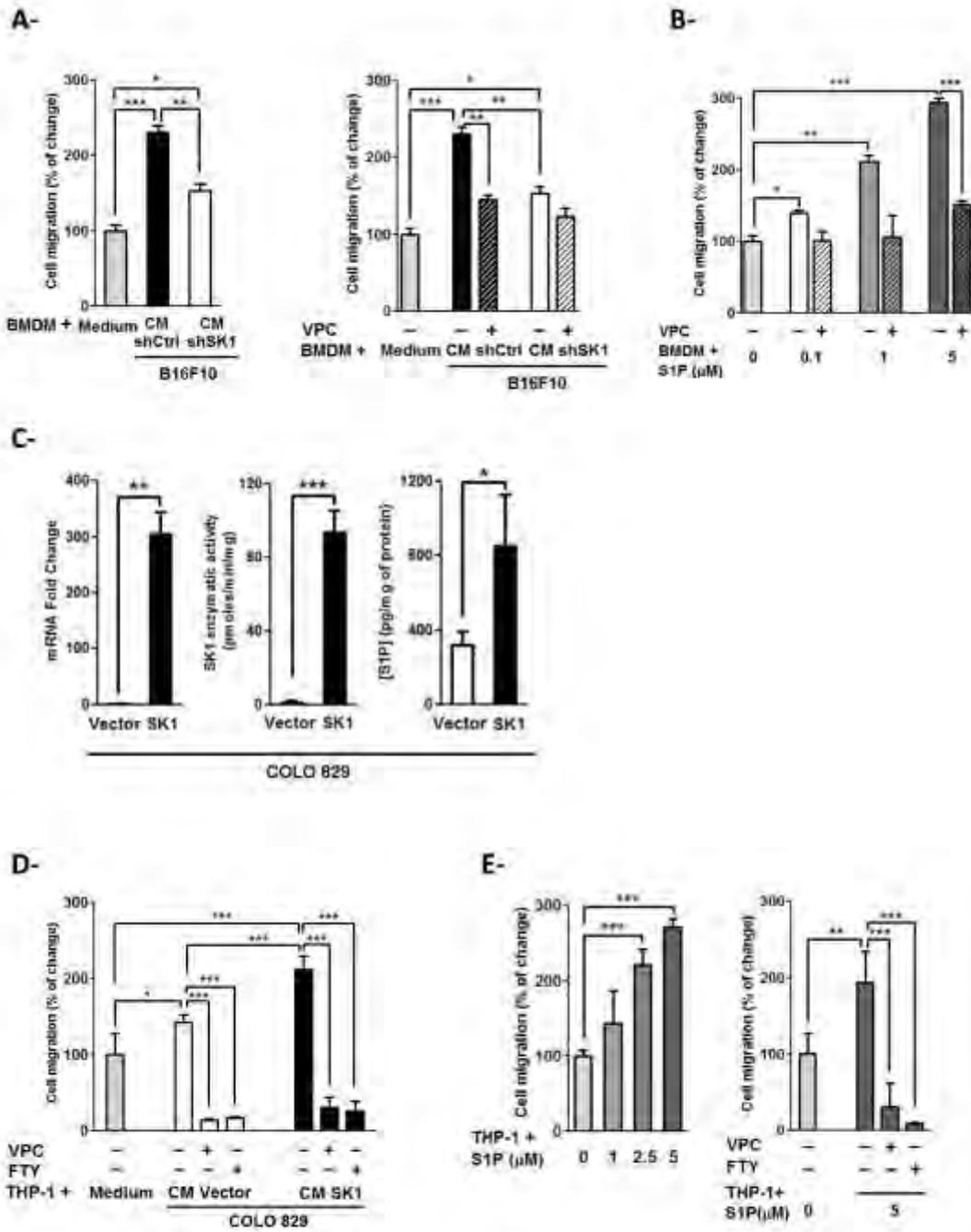


Figure 3

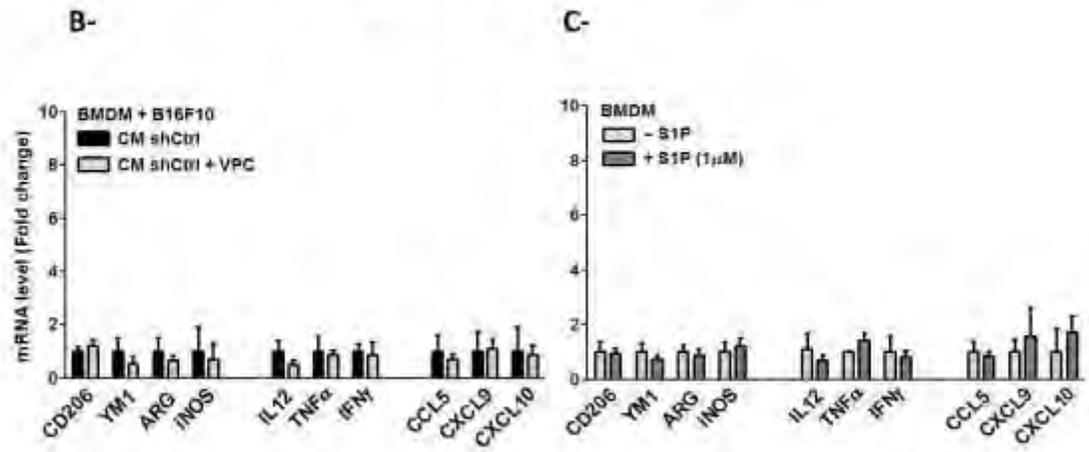
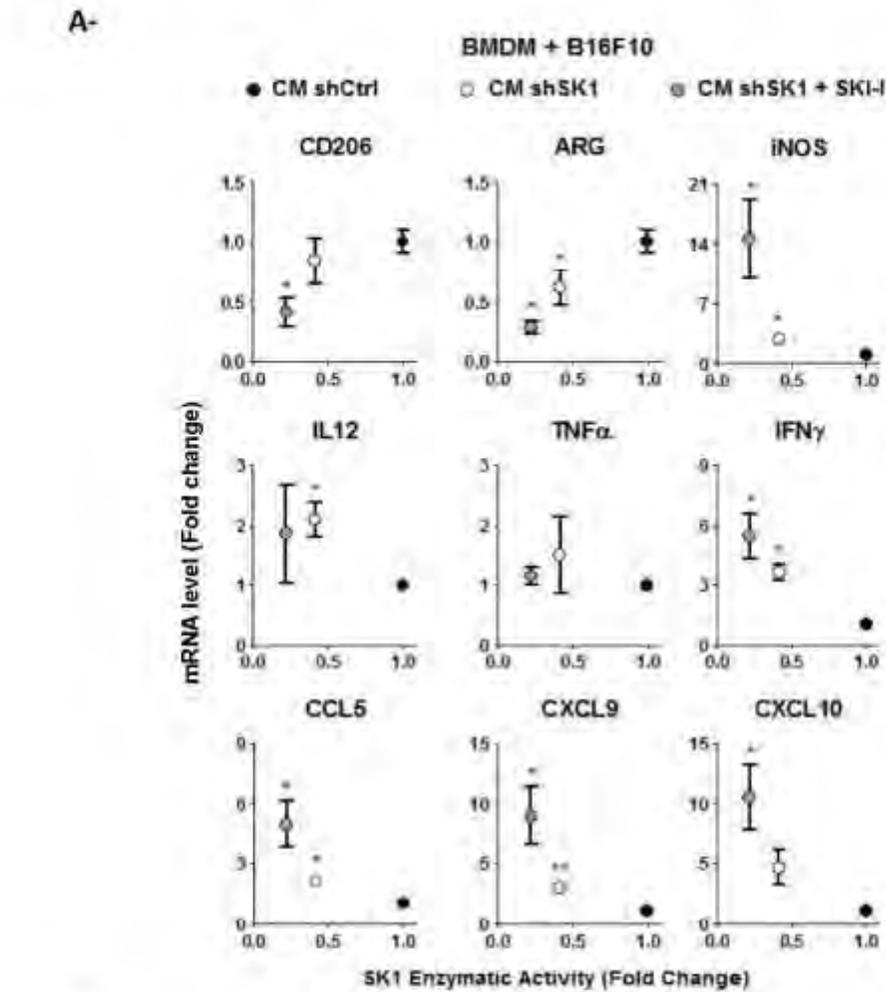


Figure 4

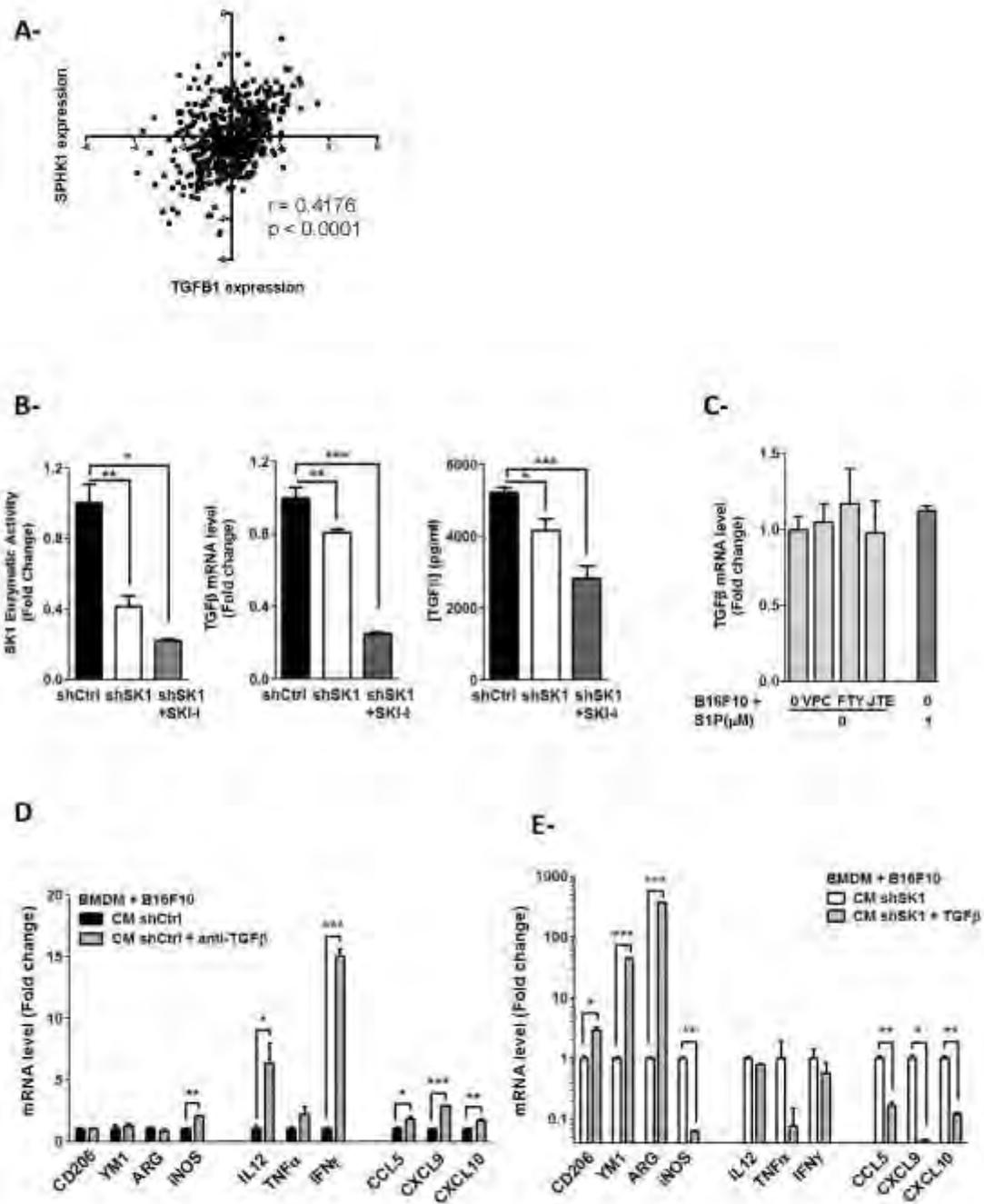


Figure 5

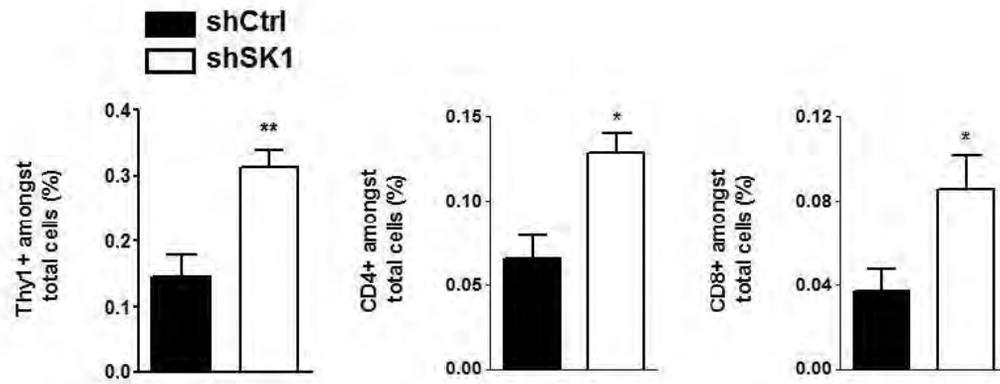


Figure S1

3- Discussion

L'inflammation a longtemps été associée à l'apparition du cancer. Une caractéristique commune du mélanome est l'infiltration des macrophages immatures à des stades précoces de la tumorigénèse. Ces cellules modulent l'activité des lymphocytes T et des cellules du stroma, elles favorisent ou inhibent la progression de la tumeur en fonction de leur densité d'infiltration et de leur état de différenciation.³²⁶

Il a été montré dans des différents modèles de tumeurs murines que la déplétion des macrophages ou leur polarisation vers un phénotype M1 anti-tumoral peut arrêter de manière significative la croissance des tumeurs.^{128, 933}

Ici, nous rapportons pour la première fois que la SK1 régule la croissance du mélanome en modulant l'infiltration des macrophages dans la tumeur. En effet, le pourcentage des macrophages dans les tumeurs est diminué lorsque la SK1 des cellules de mélanome est inhibée par un shRNA. En accord avec ces résultats, une forte augmentation de la protéine SK1 est associée à une augmentation de l'infiltration des macrophages dans les tissus tumoraux chez les souris SphK2^{-/-} développant un cancer associé à la colite. Dans ce dernier modèle, la SK1 et S1P1 stimulent la croissance tumorale et conduisent les TAM et les cellules dendritiques à produire plus d'IL-6, favorisant ainsi un microenvironnement tumoral pro-inflammatoire.⁴⁴⁸

Ces observations suggèrent que SK1 pourrait être impliquée dans la migration des macrophages conduisant à leur infiltration dans les tumeurs. *In vitro*, nos résultats démontrent que la S1P produite par la SK1 du mélanome agit comme un agent chimioattractif pour les macrophages de manière S1P1-dépendante. En effet, le traitement de BMDM avec la S1P exogène promeut la migration cellulaire comme indiqué précédemment pour les macrophages primaires humains.²⁶⁵ Le fait que la S1P produite par la SK1 du mélanome stimule l'infiltration des macrophages par l'activation des S1PRs, *in vivo*, reste encore à déterminer.

Néanmoins, dans différents modèles murins expérimentaux, FTY720 réduit le recrutement de macrophages vers les sites d'inflammation, ce qui démontre que S1P1 peut être critique pour le recrutement des macrophages *in vivo*.^{838, 938}

Notre étude a également identifié SK1 comme un régulateur clé de la polarisation des macrophages dans les tumeurs de mélanome. En effet, l'inhibition de la SK1 par un shRNA a considérablement augmenté le pourcentage de macrophages anti-tumoraux M1 dans la tumeur, et réduit la proportion de macrophages pro-tumoraux M2.⁵⁵⁵ Grâce à l'expression et la sécrétion de cytokines et de chimiokines telles que l'IL-12, CXCL9 et CXCL10, les macrophages M1 induisent le recrutement et la polarisation des cellules Th1. Réciproquement, en produisant l'IFN, les cellules Th1 peuvent conduire à la polarisation M1 classique des macrophages, amplifiant ainsi la réponse anti-tumorale de type 1.⁴⁹⁴

Nos résultats *in vitro* montrent que l'activité enzymatique de la SK1 dans le mélanome est en corrélation avec une diminution des marqueurs M1, et inversement, une augmentation des marqueurs M2 dans les BMDM. Des études antérieures ont suggéré que la stimulation du S1P1 par la S1P réduit l'expression d'iNOS, TNF- α , MCP-1 et IL-12, et induit une expression d'ARG-1 dans les macrophages traités par le LPS.³²² La S1P induit également la polarisation M2 à travers la sécrétion d'IL-4 dans les macrophages péritonéaux de souris traités par le LPS.⁶¹⁴ Ici, nous montrons que l'orientation phénotypique des macrophages induite par la SK1 du mélanome est indépendante de la liaison de la S1P aux S1PRs des macrophages. En effet, l'expression de marqueurs spécifiques aux macrophages M1 ou M2 n'a pas été affectée par le prétraitement des macrophages avec le VPC23019 avant de l'administration des surnageants des cellules de mélanome. En outre, la S1P exogène a également échoué à induire la polarisation des BMDM.

Nos observations montrent clairement que l'inhibition de la SK1 dans les cellules de mélanome se traduit par une diminution de l'expression et de la sécrétion dans le milieu de culture de TGF- β 1. Ce milieu favorise la différenciation des macrophages vers un phénotype M1 anti-tumoral. De même, la neutralisation du TGF- β 1 dans le milieu conditionné des cellules de mélanome stimule l'expression des marqueurs M1 dans les BMDM. La signalisation du TGF- β 1 a été rapportée pour être activée par la liaison de la S1P au récepteur S1P2.⁵²⁶ Ici, nous démontrons que l'expression du TGF- β 1 induite par la SK1 n'est pas médiée par une boucle autocrine de signalisation de la S1P par les S1PRs. Toutefois, étant donné que la SK1 a été montrée pour activer des facteurs de transcription tels que HIF-1 α ⁴ ou NF- κ B¹⁵ dans diverses tumeurs et que l'expression du TGF- β 1 est régulée par ces facteurs,^{324, 456} on pourrait spéculer que la SK1 régule le TGF- β 1 à un niveau transcriptionnel. Cependant, cette hypothèse reste à démontrer.

Le mélanome produit des quantités croissantes de TGF- β 1 au cours de la progression de la maladie.⁸³ Le TGF- β 1 est une cytokine immunosuppressive sécrétée, en outre, par les cellules tumorales. Elle neutralise les fonctions effectrices des macrophages, des cellules NK, des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules dendritiques, ainsi que la sécrétion de cytokines.⁹⁰² La liaison du TGF- β 1 à son récepteur présent sur les macrophages conduit à l'activation et la translocation nucléaire de molécules Smad, qui coopèrent avec d'autres facteurs de transcription pour réguler l'expression de gènes et favoriser le phénotype M2 des macrophages.⁴⁸⁵

Dans des modèles précliniques, plusieurs inhibiteurs de TGF- β , y compris des petites molécules de ciblage des récepteurs TGF- β RI et II, des anticorps monoclonaux neutralisants TGF- β 1 et des oligonucléotides antisens bloquant la production de TGF- β 1 ont démontré une activité anti-tumorale. Par exemple, dans le mélanome murin B16, la thérapie anti-TGF- β 1 en combinaison avec l'interleukine-2 a réduit le nombre de métastases pulmonaires.⁸⁹⁹ Chez les patients atteints de mélanome, les niveaux sériques de TGF- β 1 étaient significativement plus élevés que ceux du groupe contrôle.⁸³³ Récemment, une activité anti-tumorale a été décrite pour le frésolimumab, un anticorps monoclonal neutralisant le TGF- β 1 humain, lorsque celui-ci a été administré à des patients atteints de mélanome métastatique.⁵⁴³

Collectivement, nos données identifient un nouveau rôle pour l'enzyme SK1 produisant la S1P comme un régulateur clé de l'équilibre entre les macrophages inflammatoires et suppressifs dans les tumeurs de mélanome.

II- Étude du rôle de la sphingosine kinase 1 de l'hôte dans l'infiltrat immunitaire de la tumeur et la progression tumorale

1- Introduction

Il est connu que les cellules cancéreuses communiquent avec l'organisme hôte pour réguler la progression tumorale. Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu restent encore peu connus.

Dans la première partie de ce projet, nous avons montré que la S1P produite par les cellules de mélanome agit sur la différenciation des macrophages, la réponse immune et la croissance tumorale. Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés au rôle de la S1P produite par la SK1 de l'hôte sur la croissance et l'infiltrat immunitaire du mélanome. En effet, plusieurs études ont montré l'importance de la S1P systémique et/ou la SK1 de l'hôte sur la croissance de diverses tumeurs.⁸¹⁸ Chez les patients atteints d'un cancer de l'ovaire, la S1P sérique ainsi que le récepteur S1P1 sont requis pour l'angiogenèse tumorale *in vivo*.^{818, 930}

De façon intéressante, le groupe de Obeid et Hannun a montré que la déficience en SK1, qui est associée à des niveaux moins élevés de S1P sérique, bloque le développement de lymphomes thymiques dans des souris *p53*^{-/-} et prolonge leur survie.²⁹⁰ Ce groupe a aussi montré que les souris *Sphk1*^{-/-}, qui sont déficientes pour SK1, développent moins de lésions cryptiques associées au cancer du colon induit par l'azoxyméthane que les souris sauvages ou *Sphk2*^{-/-}.³⁶⁸

Notre équipe a également démontré que la coinjection de cellules de mélanome avec des fibroblastes dermiques issus de souris *Sphk1*^{-/-} inhibait la croissance tumorale ainsi que le taux de métastases en comparaison avec de fibroblastes dermiques issus de souris sauvages.¹⁰ L'ensemble de ces données démontre le rôle de la SK1 de l'hôte sur la croissance tumorale. Dans ce projet, nous nous sommes intéressés aux effets de cette kinase sur la croissance des cellules de mélanome ainsi que sur la modulation de la réponse immune anti-tumorale.

2- Résultats

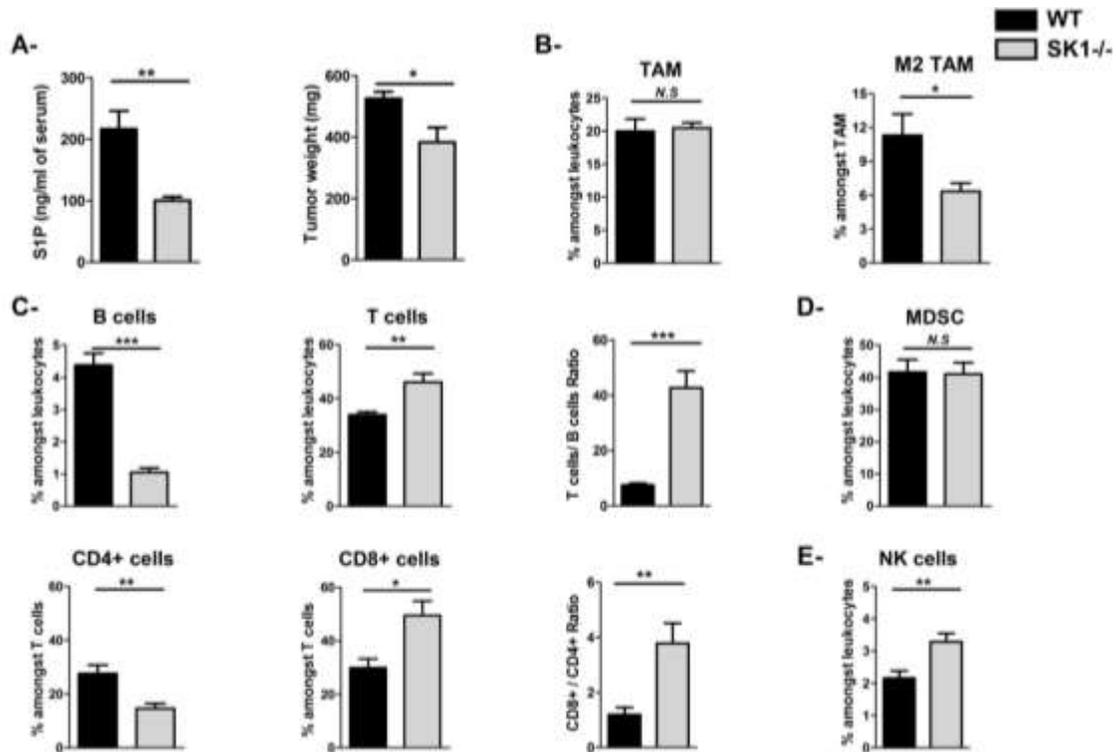


Figure 29: Host SK1 deficiency alters melanoma growth and immune infiltrate. B16F10 murine melanoma cells (3×10^5) were injected intradermally into the flank of 8-week-old C57BL/6 Wild-Type (WT) or *Sphk1*^{-/-} female mice. Thirteen days after injection, mice were sacrificed, tumors were collected, and their leukocyte content was analyzed. Bars represent means \pm sem of 6 mice per group. **A**, S1P levels in mice serum were measured via LC-MS ($n=6$ mice), and tumors were weighed 13 days after injection ($n=4$ mice). **B**, **C**, **D** and **E**, Cells were counted and the proportion of the indicated cell populations amongst indicated cells was determined by flow cytometry. **B**, Percentages of TAM (CD11b⁺ Gr1⁻ F4/80⁺) amongst leukocytes (CD45⁺) (left panel) and of M2 macrophages (CD206⁺) amongst TAM (right panel). **C**, top, Percentages of B (CD19⁺) and T (Thy1⁺) lymphocytes amongst leukocytes (CD45⁺) (left and middle panels) and representative T/B cells ratio (right panel). Bottom, Percentages of helper T (CD4⁺) and cytotoxic T (CD8⁺) amongst T lymphocytes (left and middle panels) and representative CD8⁺/CD4⁺ cells ratio (right panel). **D**, Percentage of MDSC (CD11b⁺ Gr1⁺) amongst leukocytes. **E**, Percentage of NK cells (NK1.1⁺) amongst leukocytes.

Dans le but d'évaluer l'importance de la SK1 de l'hôte dans la plasticité de la réponse immune anti-mélanome et la progression de ce cancer, nous avons injecté des cellules de mélanome B16F10 dans des souris C57BL/6 sauvages (WT) ou déficientes pour la SK1 (*Sphk1*^{-/-}).

Comme l'indique la figure 29 A, les souris *Sphk1*^{-/-} montrent une diminution des niveaux de la S1P sérique, et une diminution du poids tumoral par rapport aux souris WT. De plus, la déficience en SK1 diminue significativement la polarisation des macrophages vers le phénotype M2 protumoral (figure 29 B à droite) mais n'affecte pas leur infiltration dans la tumeur (figure 29 B à gauche) suggérant que la S1P systémique, à l'inverse de la S1P tumorale, n'établit pas le gradient nécessaire au recrutement des macrophages dans les tumeurs de mélanome. Elle est pourtant cruciale pour leur polarisation vers un phénotype M2 protumoral.

Nos travaux montrent également que le déficit en SK1 affecte l'infiltrat lymphocytaire en diminuant le pourcentage de lymphocytes B (figure 29 C en haut à gauche) et augmentant le pourcentage de lymphocytes T (figure 29 C en haut au milieu) de façon significative. Ces variations ont été traduites par une augmentation significative du rapport LT/LB (figure 29 C en haut à droite).

Parmi les lymphocytes T, la sous-population de cellules T cytotoxiques CD8⁺ (figure 29 C en bas au milieu) a été augmentée significativement aux dépens des lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ (figure 29 C en bas à gauche). Ceci se traduit par une augmentation significative du ratio T CD8⁺/ T CD4⁺ (figure 29 C en bas à droite) chez les souris *Sphk1*^{-/-} en comparaison aux WT. Ces données suggèrent que la déficience en SK1 chez l'hôte, associée à une diminution du taux sérique de S1P, oriente la réponse immunitaire adaptative vers la cytotoxicité cellulaire médiée par les lymphocytes T CD8⁺.

Les cellules NK de l'immunité innée pourraient aussi contribuer à cette cytotoxicité antitumorale puisque leur pourcentage est augmenté dans les souris *Sphk1*^{-/-} (figure 29 E). A l'inverse, le pourcentage des cellules myéloïdes suppressives MDSC n'est pas affecté par le déficit en SK1 (figure 29 D).

L'ensemble de ces résultats montre l'importance de la SK1 de l'hôte, tout comme la SK1 tumorale, dans l'échappement à la réponse anti-mélanome. Les effets de l'inhibition des deux kinases sur la croissance tumorale ainsi que la réponse immunitaire ont donc été étudiés.

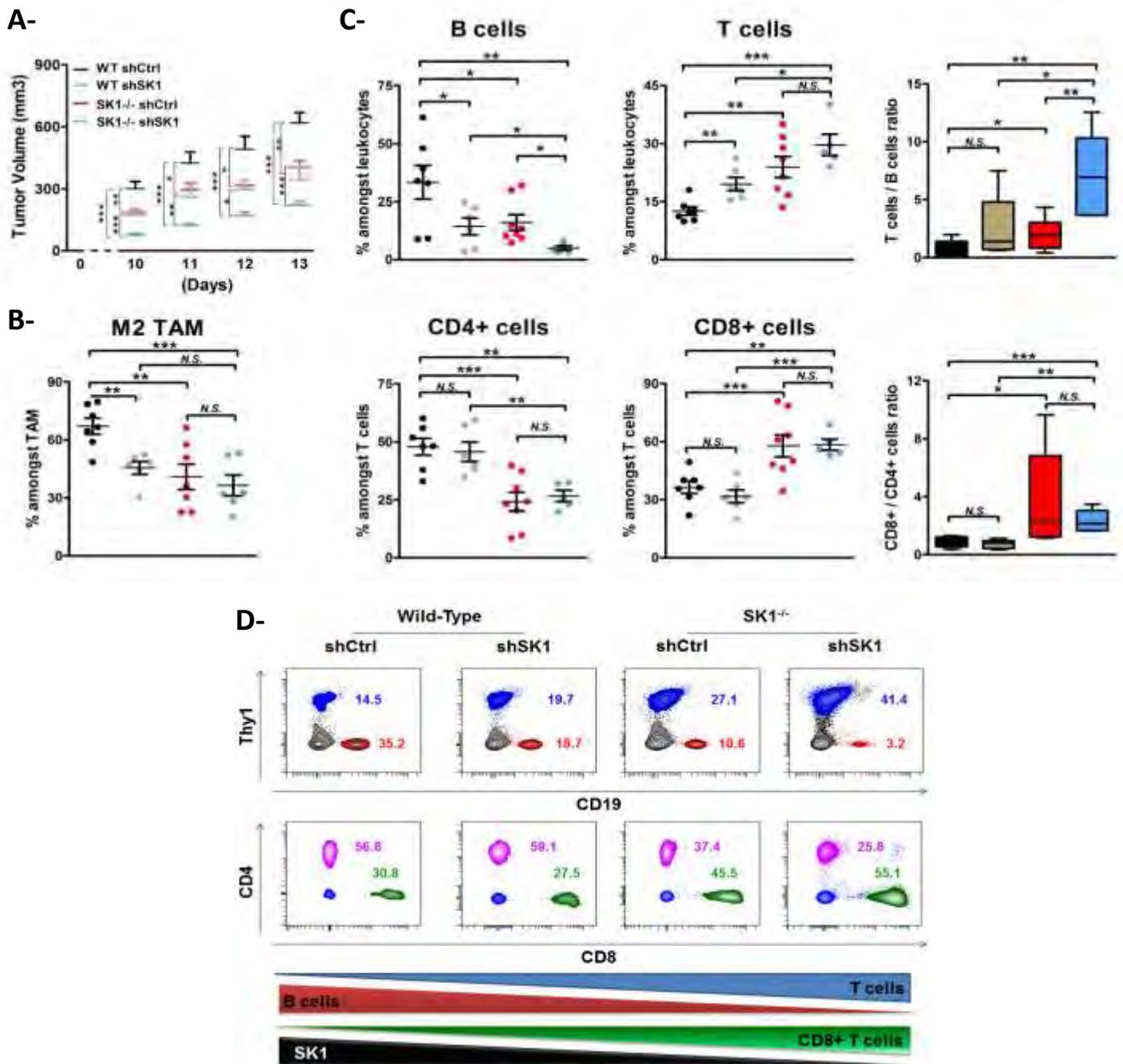


Figure 30: The SK1 deficiency both in tumor cells and host reduces melanoma growth and alters lymphocyte infiltrate. B16F10 murine melanoma cells (3×10^5) stably transfected with a control (shCtrl) or SK1 targeted shRNA (shSK1) were injected intradermally into the flank of 8-week-old C57BL/6 WT or *Sphk1*^{-/-} female mice. **A**, Tumor volume was measured at the indicated days prior to injection. Bars represent means \pm sem of 12-14 mice per group. **B**, Percentage of M2 macrophages (CD206⁺) amongst TAM (CD11b⁺ Gr1⁻ F4/80⁺) was analyzed. **C**, top, Percentages of B (CD19⁺) and T (Thy1⁺) lymphocytes amongst leukocytes (CD45⁺) (left and middle panels) and representative T/B cells ratio (right panel). Bottom, Percentages of helper T (CD4⁺) and cytotoxic T (CD8⁺) amongst

T lymphocytes (left and middle panels) and representative CD8⁺/CD4⁺ cells ratio (right panel). **D**, Illustrative dot plot showing the variation of lymphocyte subsets infiltrate depending on SK1 expression.

Dans le but d'évaluer l'impact de l'inhibition concomitante de la SK1 de l'hôte et de la tumeur sur la croissance du mélanome et l'infiltrat immunitaire, nous avons injecté des souris C57BL/6 avec des cellules de mélanome B16F10 syngéniques transfectées par un shCtrl ou un shSK1. Plusieurs combinaisons ont été réalisées (B16 shCtrl ou B16 shSK1 dans souris WT ou *Sphk1*^{-/-}) et la croissance tumorale a été évaluée en terme de volume tumoral aux jours indiqués. Nos résultats montrent que l'inhibition de la SK1 de l'hôte ou de la tumeur diminue significativement la croissance tumorale comparée à la condition contrôle. Cette diminution est accentuée par l'inhibition simultanée des deux kinases comme le montre la figure 30 A, ce qui suggère que la SK1 de l'hôte ainsi que la SK1 de la tumeur contribuent à la croissance tumorale du mélanome, non seulement séparément, mais aussi d'une manière synergique.

De plus, l'inhibition de la SK1 de l'hôte via le modèle *Sphk1*^{-/-} et/ou de la SK1 tumorale via les cellules B16F10 shSK1 est associée à une diminution de la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 protumoral. Cette diminution semble plus importante lorsque les deux kinases sont inhibées par rapport à la condition contrôle, mais la différence reste non significative (pour 6 souris) comparée aux conditions où la SK1 n'est inhibée que dans un seul compartiment (figure n B). En ce qui concerne la population lymphocytaire, l'inhibition de l'une ou l'autre des SK1 conduit à une diminution de l'infiltrat des lymphocytes B (figure 30 C en haut à gauche) et à une augmentation de l'infiltrat des lymphocytes T (figure 30 C en haut au milieu), aboutissant à une augmentation du ratio L_T/L_B (figure 30 C en haut à droite) d'une façon significative. Ces effets sont significativement amplifiés par l'inhibition simultanée des deux SK1.

L'inhibition de la SK1 de l'hôte est aussi associée à une diminution significative de l'infiltrat des lymphocytes T CD4⁺ (figure 30 C en bas à gauche) et inversement, à une augmentation de l'infiltrat des lymphocytes T CD8⁺ (figure 30 C en bas au milieu), ce qui augmente le rapport T CD8⁺/ T CD4⁺ (figure 30 C en bas à droite). Aucune variation n'a été observée pour la SK1 tumorale sur les populations T CD4⁺ et CD8⁺ contrairement à ce que nous avons rapporté dans la première partie du projet après 10 jours de greffe. Cette absence de variation pourrait être due au fait que les pourcentages de ces sous-populations lymphocytaires ont été calculés par rapport au

pourcentage de cellules T totales, qui subit une augmentation significative (figure n C, haut au milieu).

La figure D représente un dotplot illustratif des variations de l'infiltrat des différentes sous-populations lymphocytaires en fonction de l'expression de SK1. Ainsi, nous avons montré que l'inhibition combinée de la SK1 de la tumeur et de l'hôte est associée à une augmentation de la réponse T (Thy1⁺), une diminution de la réponse B (CD19⁺), une augmentation de la réponse T cytotoxique (CD8⁺) et une diminution de la réponse T auxiliaire (CD4⁺).

3- Discussion

Sutphen et ses collègues ont démontré le potentiel de la S1P d'être un marqueur plasmatique de cancer. Dans cette étude les auteurs ont observé que les niveaux systémiques de la S1P chez les patients atteints du cancer de l'ovaire ont été plus élevés que ceux des témoins.⁸¹⁸ En outre, il a été démontré que les taux de S1P circulante ont été plus élevés chez les souris atteintes du cancer du côlon par rapport aux souris saines.³⁶⁹ De façon intéressante, l'injection intraveineuse de l'anticorps neutralisant anti-S1P chez des souris greffées de cancer de sein ou de l'ovaire était associée à une régression tumorale, rajoutant une évidence sur le rôle de la S1P systémique dans la progression du cancer.⁸⁷²

Toutefois, il est difficile de trancher si la S1P est un biomarqueur du cancer vu que cette observation pourrait être faussée par le fait que les érythrocytes^{279, 585} et les plaquettes¹⁷⁶ constituent la source principale de la S1P circulante. En effet, Nunes et ses collègues ont montré que la S1P circulante était significativement plus faible chez les patients atteints du cancer de la prostate que chez les témoins sains, et que cette observation était corrélée avec une régulation négative de l'activité de la SK1 érythrocytaire.⁵⁷⁶

Dans cette partie du projet on a pu démontré que la diminution de la S1P circulantes chez des modèles de souris déficientes en SK1 a corrélé avec une diminution de la croissance tumorale et le changement de l'infiltrat immunitaire en faveur d'une réponse anti-tumorale cytotoxique illustrée par une augmentation significative de l'infiltrat des cellules NK et du rapport lymphocytes T CD8⁺/ T CD4⁺, simultanément à la levée de la réponse immunosuppressive

médiée par les macrophages M2. Ces résultats montrent l'importance de la SK1 de l'hôte et de la S1P circulante en tant que marqueur de la progression du mélanome. Le ciblage de la S1P systémique par un anticorps neutralisant par exemple, ou l'utilisation de ce dernier en tant que thérapie adjuvante aux thérapies classiques pourrait sensibiliser les cellules de mélanome aux traitements anti-cancéreux apporter un avantage thérapeutique à ce niveau.

De façon intéressante le ciblage simultané des deux SK1 de l'hôte et de la tumeur a renforcé l'effet protecteur contre la croissance tumoral et a favorisé une réponse immunitaire dirigée vers les cellules T aux dépens de la réponse humorale des cellules B.

L'ensemble de ces résultats suggèrent l'importance simultanée de la SK1 du mélanome, généralement induite par les mutations des kinases en aval telles que Braf, et de la SK1 de l'hôte produite par les différentes cellules de l'individu notamment les cellules endothéliales, les érythrocytes et les plaquettes, dans l'infiltrat immunitaire et la progression de ce cancer. Un dépistage du profil sphingolipidique dans la tumeur et le sang serait d'intérêt pour une utilisation éventuelle d'une approche de ciblage de l'axe SK1/ S1P dans le mélanome.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

I- Conclusion générale

L'objectif de notre étude était de définir le rôle de la SK1 tumorale dans le recrutement et la polarisation des macrophages au sein du mélanome. Grâce aux outils génétiques (shRNA dirigés contre SK1) et pharmacologiques (SKI-I), nous avons pu montrer que le ciblage de la SK1 tumorale permettait de promouvoir une réponse immune anti-tumorale.

Nous avons ainsi montré que l'inhibition de la SK1 tumorale réduit l'infiltration de la tumeur par les macrophages, qui sont généralement associés à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers y compris le mélanome.^{346, 419} Nos données montrent également que ce recrutement est médié par la liaison de la S1P, produite par la SK1 du mélanome, au récepteur S1P1, qui est exprimé sur les macrophages.

De plus, l'inhibition de la SK1 du mélanome potentialise le phénotype M1 anti-tumoral des macrophages au dépend du phénotype M2, déplaçant ainsi la balance macrophagique au profit d'une orientation Th1 et d'une réponse immunitaire antitumorale plus prononcée. Ainsi, l'inhibition de la SK1 dans les cellules du mélanome est associée à une augmentation de l'expression de cytokines et chimiokines, telles qu'IL-12 et CXCL9, qui stimulent une réponse Th1, et induisent une diminution de la croissance tumorale.

Nos résultats montrent que le changement phénotypique des macrophages associé à l'inhibition de la SK1 dans les cellules de mélanome, est indépendant de l'axe S1P/S1PR. Plusieurs facteurs potentiellement responsables de cette polarisation ont été investigués, en particulier, L'IL-4, l'IL-10, l'IL-13 et CCL2 qui sont connus pour induire un phénotype M2, et l'IFN- γ connu pour l'induction des macrophages M1. Ces facteurs étaient ou bien non exprimés par les cellules de mélanome B16F10 ou bien n'ont montré aucun changement d'expression suite à l'inhibition de la SK1. l'inverse, le taux de TGF- β 1, qui stimule la polarisation M2 des macrophages ainsi que la réponse des cellules T régulatrices, est diminué suite à l'inhibition de SK1. En accord avec ces données, une corrélation positive entre l'expression du TGF- β 1 et celle de la SK1 a été observée dans des tumeurs de patients atteints de mélanome. *In vitro*, nous avons montré que la neutralisation du TGF- β 1 dans le milieu conditionné provenant des cellules du mélanome, ou à

l'inverse, l'addition de TGF- β 1 recombinante dans le milieu de cellules de mélanome ayant une SK1 inhibée, a confirmé que la polarisation M2 des macrophages induite par la SK1 tumorale est médiée par le TGF- β 1. La régulation de TGF- β 1 par la SK1 est indépendante de l'axe S1P/S1PR, suggérant une activité intracellulaire de la SK1. (Figure 31)

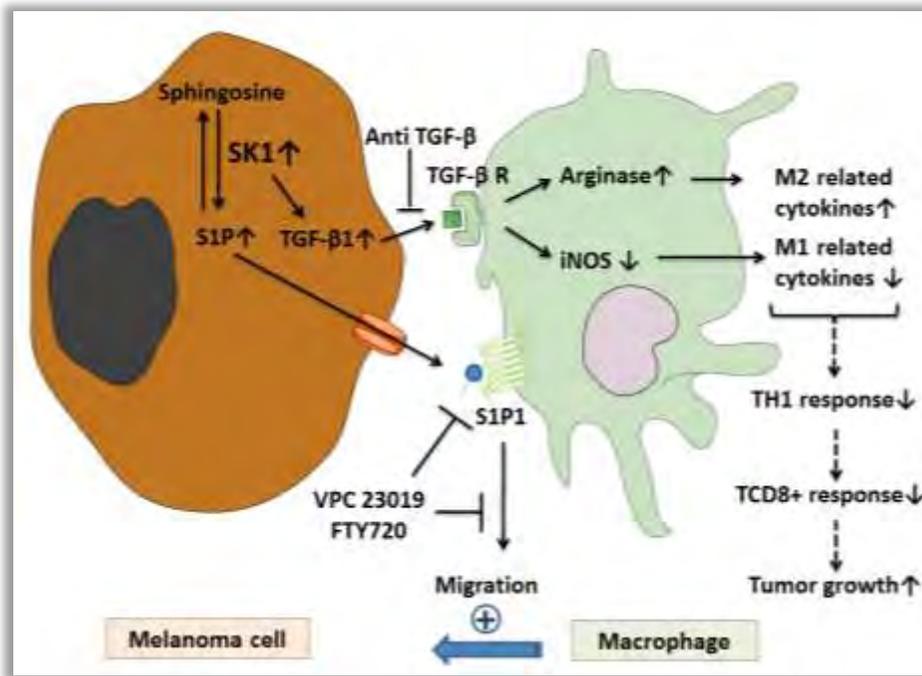


Figure 31: Schéma récapitulatif du rôle de la SK1 du mélanome dans la migration et la polarisation des macrophages, ainsi que dans la réponse immunitaire associée.

L'ensemble de ces résultats montre l'importance de la SK1 tumorale dans la suppression de la réponse immunitaire anti-mélanome.

Le deuxième axe de notre recherche s'est focalisé sur le rôle de la SK1 de l'hôte sur l'infiltrat leucocytaire. Grâce au modèle de souris SK1^{-/-}, nous avons montré que la déficience en SK1 de l'hôte, concomitante avec une diminution de la S1P circulante, est associée à l'inhibition de l'orientation M2 des macrophages ainsi qu'à une réponse antitumorale NK et LT CD8⁺ plus marquée. L'inhibition simultanée de la SK1 de la tumeur et de l'hôte diminue davantage la croissance tumorale et potentialise l'immunité cellulaire par rapport à l'immunité humorale ce

qui est illustré par un rapport LT/LB significativement plus marqué par rapport au reste des conditions où l'une et/ou l'autre des SK1 a été toujours valide.

En conclusion, cette étude a permis de montrer, pour la première fois, le rôle clé de la SK1 du mélanome dans le recrutement et la polarisation des macrophages associés à la tumeur. Des études antérieures avaient déjà décrit le rôle de la S1P sur le remodelage du stroma tumoral, notamment sur les fibroblastes^{10, 393} et les cellules endothéliales^{411, 872}. Ce travail montre maintenant l'importance de la SK1/S1P dans la réponse immune anti-mélanome et la possibilité de cibler cette voie afin de sensibiliser les cellules de mélanome aux traitements thérapeutiques.

II- Perspectives

Dans ce travail nous avons montré que la régulation à la baisse de la SK1 dans les cellules de mélanome est suivie de la réduction du phénotype M2 des macrophages en faveur d'une augmentation du phénotype M1 au sein de la tumeur. L'ensemble des expériences *in vitro* et *in vivo* proposent que la migration des macrophages dépend de la liaison de la S1P à son récepteur S1P1 exprimé par ces cellules, alors que leur polarisation dans la niche tumorale dépend de la génération et de la sécrétion de TGF- β 1 induite par la SK1. De même la SK1 du mélanome et/ ou de l'hôte s'est avérée importante pour l'orientation de la réponse immunitaire adaptative et la modulation de la croissance tumorale. Son inhibition a permis la potentialisation d'une réponse cytotoxique NK/ LT CD8⁺ dépendante et ainsi la diminution de la croissance des tumeurs murines du mélanome. Bien que ce travail ait montré un rôle inédit de la SK1 dans le mélanome et son infiltrat immunitaire, divers points nécessitent d'être approfondis.

1- Régulation de l'expression des enzymes du métabolisme de la S1P dans les cellules de mélanome

La SK1 est surexprimée dans les cellules de mélanome par rapport aux mélanocytes normaux. Les mécanismes conduisant à la surexpression de la SK1 dans le mélanome ont été investigués

dans notre équipe.¹⁰ De façon intéressante, ce travail a montré que l'augmentation de l'expression de la SK1 est sous le contrôle de la cascade RAS/RAF/MAPK/ERK, une voie très fréquemment activée dans le mélanome.¹⁰ Cependant les mécanismes de régulation de SK1 au niveau transcriptionnel n'ont pas été encore élucidés. Pour compléter ces données, il serait intéressant d'étudier l'activité du promoteur de la SK1 suite à la stimulation par différents régulateurs transcriptionnels et de se pencher sur les mécanismes épigénétiques de régulation de la SK1, pour fournir une vision plus globale à ce sujet.

De plus, comme le métabolisme de la S1P n'est pas seulement limité à l'activité de la SK1, il serait intéressant d'étudier les mécanismes à l'origine de l'accumulation de la S1P dans les cellules de mélanome. En effet, tandis que la SK2 n'est pas surexprimée dans ces cellules, les expressions de la SPP1 et de la SPL, sont par contre diminuées par rapport à des mélanocytes sains.¹²⁶ L'étude des mécanismes moléculaires de régulation de ces enzymes permettrait d'établir des stratégies thérapeutiques visant le rhéostat sphingolipidique céramide/S1P, afin de limiter la croissance, la prolifération et la migration des cellules tumorales.

2- Sécrétion de la S1P

Dans ce projet, une diminution de la quantité de S1P a été montrée dans la tumeur ayant une SK1 inhibée. Dans ces conditions, la migration des macrophages est diminuée. A l'inverse, une augmentation de la migration de ces cellules a pu être observée lorsque l'expression de la SK1 tumorale est augmentée. Cet effet est dépendant de la S1P et de l'expression du récepteur S1P1 à la surface des macrophages. Ces résultats suggèrent que la S1P produite par les cellules de mélanome a été sécrétée dans le milieu extracellulaire afin d'agir sur ses récepteurs. Or, les transporteurs de la S1P présents sur les B16F10 n'ont pas été étudiés.

De façon intéressante, il a été récemment démontré que les cellules D10 CD133⁺ de mélanome surexpriment une multitude de transporteurs de la famille ABC impliqués dans la multi-résistance aux médicaments.⁷¹³ Or ces transporteurs sont également impliqués dans l'excrétion de la S1P cellulaire comme déjà évoqué dans le chapitre III. Il serait donc intéressant de déterminer la nature des transporteurs exprimés par les cellules B16F10 et de déterminer si cette expression est dépendante ou non des taux intracellulaires de S1P.

Enfin, des stratégies d'inhibition de ce transporteur pourrait être étudiées sur la migration des macrophages induite par les cellules de mélanome.

3- Signalisation induite par la S1P dans les macrophages

Dans ce travail, nous avons montré que la S1P provenant de la tumeur est capable d'induire *in vitro* la migration des macrophages d'une manière dépendante de sa liaison à son récepteur S1P1, et ceci par l'utilisation des antagonistes VPC23019 qui antagonise S1P1/3 et FTY720 qui induit l'internalisation et la dégradation du S1P1. Or les voies de signalisation en aval de ce récepteur, potentiellement impliquées dans la migration des macrophages, n'ont pas été étudiées. Nous pensons plus particulièrement à étudier l'expression des petites protéines G comme Rho et Rac, et de l'effet de leur inhibition sur la migration macrophagique.

4- Effet des inhibiteurs pharmacologiques de la SK1 sur l'infiltrat immunitaire et la croissance tumorale in vivo.

Dans cette étude, le rôle de la SK1 tumorale sur le recrutement et la polarisation des macrophages a été investigué par des outils génétiques (shRNA). Il serait intéressant de reproduire *in vivo* les résultats obtenus *in vitro* avec le SKI-I qui inhibe la sphingosine kinase 1. En effet, nous avons démontré qu'*in vitro*, le SKI-I, en combinaison avec le shRNA SK1, est capable d'inhiber davantage l'activité SK1 et de renforcer ainsi l'expression des marqueurs M1, avec une meilleure inhibition des marqueurs M2. On peut donc supposer que cette orientation vers un phénotype M1 des macrophages serait observable *in vivo* après l'injection du SKI-I chez la souris. Ceci pourrait ouvrir un volet sur l'utilisation thérapeutique des inhibiteurs pharmacologiques de la SK1 dans le mélanome pour renforcer la réponse immune. De plus, d'autres inhibiteurs maintenant disponibles tels que le SLP7111228, le PF-543 et le VPC96091 qui agissent sélectivement sur la SK1 à des concentrations nanomolaires pourront aussi être testés.⁶²⁰

5- Effet du TGF- β 1 sur la réponse immune in vivo

Dans ce projet, nous avons souligné l'importance du TGF- β 1 dans la polarisation des macrophages vers un phénotype M2. De plus, nous avons montré que la neutralisation du TGF- β 1 *in vitro* pouvait réverser ce phénomène et induire une différenciation des macrophages vers un phénotype M1. Cet axe pourrait être complété par l'injection intratumorale d'un anti-TGF- β 1 chez la souris développant un mélanome et la mesure de ses effets sur le recrutement et la polarisation des macrophages *in vivo*. En effet, le TGF- β 1 agit non seulement sur la polarisation des macrophages mais permet aussi le recrutement des monocytes par la régulation positive des métalloprotéinases matricielles, et la dégradation de la membrane basale endothéliale.²⁸

Il serait aussi intéressant de regarder l'effet de TGF- β 1 sur d'autres cellules immunitaires notamment les cellules T régulatrices qui sont une cible potentielle de TGF- β 1.^{715, 923} Cette approche pourra être réalisée par cytométrie en flux en quantifiant l'infiltrat des cellules Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ dans les tumeurs de mélanome B16F10 injectées ou non par l'anti-TGF- β 1 en intratumoral.

De même, l'effet de la SK1 et du TGF- β 1 pourra être analysé sur d'autres composantes cellulaires du microenvironnement du mélanome telles que les fibroblastes (CAF), et les cellules endothéliales.

Enfin, on pourrait imaginer que le TGF- β 1 agit directement sur la cellule tumorale et stimule de manière autocrine la SK1. En effet, une publication récente montre le TGF- β 1 active l'axe SK1/S1P3 dans les myoblastes⁷⁴ Pour démontrer qu'il existe une boucle de rétrocontrôle entre la SK1 et le TGF- β 1, nous pourrions agir sur le TGF- β 1 en l'inhibant directement avec un anticorps ou en bloquant ses effets sur le TGF- β 1R.

6- Régulation de l'expression de TGF- β 1 par la SK1

Nous avons montré que l'expression de TGF- β 1 induite par la SK1 est indépendante de l'axe S1P/S1PR, suggérant une activité intracellulaire de la SK1. Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents sont encore inconnus. Étant donné que la SK1 a été montrée pour activer des facteurs de transcription tels que HIF-1 α ⁴ ou NF- κ B¹⁵ dans diverses tumeurs et que

l'expression du TGF- β 1 est régulée par ces facteurs,^{324, 456} on pourrait spéculer que la SK1 régule le TGF- β 1 à un niveau transcriptionnel.

7- L'effet de la SK1 du macrophage sur les cellules du mélanome.

Notre étude montre principalement le rôle de la SK1 tumorale dans l'infiltrat macrophagique du mélanome. Cependant, nos résultats, non publiés, évoquent aussi le rôle de la SK1 de l'hôte sur cet infiltrat. En effet, la déficience en SK1 chez les souris *Sphk1*^{-/-} a été associée à la diminution du phénotype M2 des macrophages ainsi qu'à une réponse antitumorale NK et L_T CD8⁺ plus marquée. Pour explorer le rôle de la SK1 de l'hôte, et plus particulièrement celle des macrophages, nous étudierons la croissance ainsi que la nature de l'infiltrat leucocytaire de tumeurs B16F10 injectées chez des souris *Sphk1*^{-/-} et traitées avec des liposomes contenant du clodronate, qui détruit les macrophages de manière sélective.²⁸⁰ Le rôle des L_T CD4⁺ et CD8⁺ dans la progression du mélanome chez les souris *Sphk1*^{-/-} sera évalué par immunodéplétion de ces populations avec des anti-CD4 et des anti-CD8.

ANNEXE1: Chapitre de livre

Dysregulation of Sphingolipid Metabolism in Melanoma: Roles in Pigmentation, Cell Survival and Tumor Progression

David Garandean, Marguerite Mrad, Thierry Levade,
Cristiana Perrotta, Nathalie Andrieu-Abadie, and Mona Diab-Assaf

Abstract Over the last decades, the incidence of cutaneous malignant melanoma rapidly increased in Caucasian populations. Moreover, melanoma is a leading cause of cancer death and consequently has become a significant public health problem worldwide in fair-skinned populations. The discovery of the prevalent mutation BRAFV600E, which drives melanoma cell growth, has made this oncogenic protein an ideal therapeutic target. However, the beneficial effects of BRAF-directed therapies are usually short-lived due to the appearance of resistance, which leads to disease progression. This emphasizes the need to develop new therapeutic approaches that could overcome tumor relapse. Alterations in sphingolipid metabolism are associated with melanoma progression and represent an exploitable target for the development of novel chemotherapeutics. The aim of this review is to concentrate on the critical metabolites and enzymes that contribute to this metabolic

Author contributed equally with all other contributors

D. Garandean • M. Mrad • N. Andrieu-Abadie, Ph.D. (✉)
Inserm UMR1037, Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer 2013, Centre de Recherches en
Cancérologie de Toulouse, Oncopôle de Toulouse, 2 Avenue Hubert Curien, CS 53717,
31037 Toulouse Cedex 1, France

Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France
e-mail: nathalie.andrieu@inserm.fr

T. Levade
Inserm UMR1037, Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer 2013, Centre de Recherches en
Cancérologie de Toulouse, Oncopôle de Toulouse, 2 Avenue Hubert Curien, CS 53717,
31037 Toulouse Cedex 1, France

Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France
Laboratoire de Biochimie Métabolique, CHU, Toulouse, France

C. Perrotta
Unit of Clinical Pharmacology, National Research Council Institute of Neuroscience,
Department of Biomedical and Clinical Sciences, University Hospital L. Sacco,
Università di Milano, Milan, Italy

M. Diab-Assaf
Faculty of Sciences II, Chemistry Department, Lebanese University, Beirut, Lebanon

© Springer International Publishing Switzerland 2015
Y.A. Hannun et al. (eds.), *Bioactive Sphingolipids in Cancer Biology
and Therapy*, DOI 10.1007/978-3-319-20750-6_6

123

dysregulation in melanoma, to discuss the emerging roles of sphingolipids on melanogenesis, tumor microenvironment and melanoma progression, and to highlight relevant therapeutic approaches applicable for melanoma treatment.

Keywords Acid sphingomyelinase • BRAFV600E • Melanoma • Metabolism • Metastasis • Microenvironment • MITF • Myofibroblasts • Resistance • Sphingosine-1-phosphate

1 Melanoma: A Dreadful Cancer

Although far less prevalent than non-melanoma skin cancers, cutaneous melanoma is the major cause of death from skin cancer. The incidence of this cancer is also one of the most rapidly growing worldwide, with a consistent increase in Caucasian populations over the past four decades. This trend is predicted to continue increasing for at least over the next two decades, with a doubling of incidence rates [1, 2]. Cutaneous melanoma is a heterogeneous disease that arises through the stepwise transformation of melanocytes within the basal epidermal layer of the skin and evolves due to a myriad of genetic and epigenetic aberrations correlated or not with the person's UV exposure behaviour. Based on the clinical and histopathological characteristics, cutaneous melanoma is classified into four categories: superficial spreading, nodular, lentigo maligna, and acral lentiginous melanoma, according to the site of origin, the UV light exposure and the duration of preinvasive growth. It can arise from a pre-existent nevus or even from healthy skin.

Patients with early stage melanomas can be treated successfully by surgery; however, one in ten will develop disseminated disease. The prognosis for patients with stage IV melanoma remains poor with a median overall survival of 9–11 months, and 1-year and 5-year survivals of about 33 % and 15 %, respectively. Highly aggressive, metastatic melanoma is notoriously refractory to standard treatments such as chemo- and radiotherapy [3]. Moreover, although very promising with meaningful effects on progression-free survival (PFS), new targeted therapies are either effective on only a few patients, e.g., in the case of ipilimumab, an immune-modulating antibody that targets CTLA-4 on T lymphocytes [4] or will lead to a relapse due to a pre-existing or acquired resistance, e.g., for vemurafenib, a BRAF inhibitor [5]. Clearly, as a multifaceted disease, skin melanoma is far from being under control. This implies that studies of the genetic and cellular events underlying melanoma development must continue to better elucidate the pathogenesis of the disease and generate more efficient and personalized approaches both for diagnosis and treatment.

2 SL Metabolism Is Deregulated in Melanoma

Ceramides play an essential role in skin homeostasis [6]. Dysregulation of ceramide metabolism has been identified in inflammatory skin diseases such as atopic dermatitis and psoriasis vulgaris [7]. Interestingly, we recently showed that ceramide

formation is also strongly altered in melanoma skin cancer. In particular, a β -glucocerebrosidase, encoded by the *GBA2* gene is under-expressed in melanoma cells compared to healthy melanocytes promoting the accumulation of its substrate, glucosylceramide (GlcCer) and a decrease of ceramide, in tumor cells [8]. This might be related to the presence of tumor-associated mutations in the promoter region or coding sequence of the *GBA2* gene or to some epigenetic change. Although this hypothesis remains to be tested, some reports suggest that patients with Gaucher disease, who are molecularly characterized by a deficient activity of the lysosomal β -glucocerebrosidase *GBA1* resulting in GlcCer accumulation, are at increased risk of developing specific malignancies such as melanoma [9]. In particular, the N370S mutation in the *GBA1* gene is associated with an increased risk to develop solid cancers including melanoma and hematological malignancies [9, 10]. For instance, in a study of 1525 patients, the relative risk for non-Hodgkin lymphoma was 2.54, for melanoma 3.07 and for pancreas cancer 2.37 [9]. The pathogenesis of cancers in Gaucher patients has not yet been elucidated although it has been proposed that the lipid storage that occurs primarily in monocytic cells and macrophages leads to chronic stimulation of the immune system and subsequent lymphoproliferation [10]. Interestingly, a host-related immunogenetic profile has been proposed to be of importance for susceptibility and tumorigenesis in malignant melanoma [11].

Moreover, a significant association between the presence of mutations in the *GBA1* gene and Parkinson's disease was found [12]. Intriguingly, patients with Parkinson's disease showed a sevenfold increased relative risk for melanoma [13]. In addition, it has been reported that *PARKIN*, encoded by the major Parkinson disease-predisposing gene *PARK2*, regulates the polyubiquitination and proteasomal degradation of misfolded mutants of *GBA1* [14]. These observations suggest that some genetic determinants of SL metabolism could be associated with cutaneous melanoma predisposition. However, whether and how germline mutations of *GBA* genes lead to melanoma development in patients with Gaucher or Parkinson's diseases remain to be demonstrated.

In addition, a genome-wide association study has identified the 1q21.3 chromosomal region, containing *LASS2* gene that encodes the dihydroceramide synthase 2 (*CERS2*), as a locus predisposing to cutaneous melanoma [15]. *CERS2*, a synthase of long-chain ceramides (C22-C24), is also known as tumor metastasis suppressor gene 1 (*TMSG1*). Recently, it has been reported that silencing of *LASS2/TMSG1* enhances prostate cancer cell invasion and metastasis [16]. However, it was not established whether cancer progression was associated with decreased ceramide levels or other modifications in SL metabolism due to the down-regulation of *LASS2*.

Looking at the enzymes involved in the generation of ceramide through the hydrolysis of sphingomyelinase, it has been recently reported, in human specimens of melanomas at various stages, that acid sphingomyelinase (acid SMase) expression inversely correlates with tumor malignancy, being lower in lymph node metastases with respect to benign nevi [17]. These results were confirmed in vivo in a mouse model of melanoma by two pieces of evidence: (1) after subcutaneous injection to C57BL/6 mice, the expression of acid SMase was higher in B16-F1-derived tumors

than in the more metastatic B16-F10 ones; (2) the expression of acid SMase by the B16-generated tumors decreased progressively during melanoma growth [17].

Besides these observations, ceramide catabolism is also enhanced in melanoma cells. Indeed, mining of the cancer profiling database Oncomine reveal significantly elevated expression of *ASAHI* in melanoma biopsies compared with benign melanocytic lesions [18, 19]. We also reported that the expression of proteins encoded by *SPHK1*, *SGPPI* and *SGPL1* genes was altered in a series of invasive or metastatic melanoma cells as compared to that of healthy melanocytes [20, 21]. These changes are expected to lead to an increased production of ceramide metabolite, sphingosine 1-phosphate (S1P), in tumor cells. This was confirmed by measuring both *SPHK1* activity in vitro and expression in human melanoma specimens compared to nevi. The lipid kinase was overexpressed in the four main histologic subtypes of cutaneous melanoma. Moreover, owing to frequent *BRAF* or *NRAS* mutations in melanocytic neoplasms, which are, for the vast majority of them, single amino acid changes such as at codon 600 (*BRAFV600E*) or 61 (*NRASQ61L*), the *RAS/RAF/MEK/ERK* signaling pathway is activated, representing a major event in the metastatic progression of melanoma [22]. By using pharmacological and genetic approaches, we showed that *SPHK1* expression/activity is increased by *ERK* activation due to *BRAF* or *NRAS* mutations in melanoma cells [21].

Dysregulation of SL metabolism in melanoma cells not only affects ceramide, GlcCer, and S1P but also other yet unidentified derivatives. For instance, melanoma cells contain high amounts of certain gangliosides (which derive from GlcCer), some of them being considered as melanoma-specific antigens [23]. These changes have also been associated to increased serum ganglioside levels in melanoma patients compared to melanocytic patients or healthy individuals, and could be predictive of a decrease in the overall survival [24]. Finally, as in many tumors, dysregulations in melanoma may combine many anabolic and catabolic reactions leading to the formation of multiple SL metabolites. A complete lipidomic profile associated to melanocytic tumor imaging would be highly useful tools to define new SL-based targets and assist in directing antitumoral therapy.

3 Role of SLs in Melanogenesis

Melanogenesis involves different stages, from melanocyte embryogenesis to melanosome transfer from melanocytes to keratinocytes. Melanocytes derive from neural crest melanoblasts that migrate to different destinations, including the basal layer of the epidermis and hair follicles [25]. To protect skin towards the deleterious effects of ultraviolet light, melanocytes synthesize and introduce melanin into specialized lysosome-related organelles called melanosomes, which move along arm-like structures called dendrites, so as to reach the keratinocytes.

Analysis of the biology of melanocytes and skin pigmentation is important to better understand the complex system of melanoma development and progression [26]. For instance, a dual role has been ascribed to the basic helix-loop-helix leucine

zipper microphthalmia-associated transcription factor (MITF). Not only MITF activates the transcription of genes involved in melanin synthesis, melanosome biogenesis and transport, but it is also reported as an amplified oncogene in a subset of human melanomas in which it controls proliferation, migration and invasion [27]. Treatment of B16F10 murine melanoma cells with SL-enriched fraction from human placenta stimulates melanin production by inducing tyrosinase gene expression [28]. The characterization of lipids, by MALDI-TOF mass spectrometry, indicated the presence of sphingosine and S1P in the active fraction, and identified the fatty acid moiety as palmitic acid (C16:0) and oleic acid (C18:0) [29]. The human placental lipids induce the p38 stress-signalling pathway [30] leading to phosphorylation of the cyclic AMP response element binding protein (CREB), which in turn activates MITF expression and consequently increases tyrosinase expression and pigmentation [29, 31]. Interestingly, topical application of a purified SL fraction to age-onset gray-haired C57BL/6J mouse skin, that exhibit decaying MITF expression, reversed the hair greying phenotype by inducing the re-growth of thick black hair with MITF-positive differentiated melanocytes found near the dermal papille [29].

These observations strongly suggest that some sphingoid bases may have the ability to activate MITF expression when added to melanoma cells. However, addition of exogenous S1P to the spontaneously immortalized mouse cell line Mel-Ab was shown to reduce melanin synthesis by ERK activation, MITF phosphorylation at Ser73 and degradation by the proteasome. This effect was associated with subsequent down-regulation of tyrosinase and tyrosinase-related protein 1 [32] and was mediated by S1PR3 receptor activation [33]. On the other hand, modulation of acid SMase has been demonstrated to control MITF expression during melanoma growth, MITF expression being increased in B16-derived tumors at late stages of progression, i.e., when the expression of acid SMase becomes down-regulated [17]. Of importance, acid SMase induced the degradation of MITF by proteasome activation through a sustained activation of ERK. By affecting MITF expression acid SMase determined the modulation of its downstream pathway. Whenever MITF was up-regulated, because of the low expression of acid SMase, the proliferation marker cyclin-dependent kinase 2, the apoptosis modulator Bcl-2, the melanin synthesizing enzyme tyrosinase and the pro-metastatic c-Met were up-regulated, thus leading to a more aggressive melanoma cell phenotype [17].

4 Role of SLs in Melanoma–Stroma Interactions

Although genetic changes are indisputable causes of formation and progression of melanoma, they are also influenced by the adjacent microenvironment [34]. Melanoma is composed of not only the malignant cells but also normal skin cells, such as fibroblasts, endothelial, and immune cells, alongside the melanocytes, all of them embedded in the extracellular matrix (ECM). Altogether, they constitute a special microenvironment in which disturbed homeostasis may facilitate tumor development. Understanding the role of these cells or molecules that allow

interactions of normal cells with melanoma cells could be useful for designing potential combinations of specific target therapies and immunotherapies that could be more efficient approaches against malignant melanoma [35].

In many tumors, after intracellular production by SPHKs, S1P is released outside cancer cells and can activate S1P receptors in the surrounding microenvironment in a paracrine manner [36]. Here, we will review the current knowledge of the roles of S1P on the remodelling of tumor microenvironment in melanoma.

4.1 Effect of S1P on Angiogenesis

Melanoma invasion can take place when cells produce critical angiogenesis-related growth factors, such as VEGF [37], bFGF/FGF-2 [38], Ang-1 and Ang-2 [39]. These factors stimulate the proliferation of endotheliocytes of the vessels of the near-connective tissue and then contribute to the formation of a new vascular system that will supply oxygen and nutrients to tumour cells [40]. Proangiogenic factors promote lymphatic and hematogenous metastasis and are associated with higher disease burdens and worse outcomes in melanoma. For instance, a positive correlation between increased serum VEGF, bFGF and IL-8 levels and a shorter disease-free survival was reported in patients with metastatic melanoma [41]. Similarly, expression of hypoxia-inducible factors (HIFs), global regulators of oxygen homeostasis, was associated with poorer prognosis in patients with metastatic melanoma [42]. The anti-angiogenic agents that have been tested so far, such as bevacizumab, axitinib or dovitinib, offer little benefit as single agents, but in combination with cytotoxic agents are promising for patients who may be ineligible for currently FDA approved first-line therapy with vemurafenib or ipilimumab or in patients for whom this therapy has failed [43].

In many tumors, hypoxia induces the release of S1P from cancer cells. Extracellularly released S1P is a robust pro-angiogenic factor that promotes angiogenesis directly as well as indirectly by stimulating VEGF secretion. Conversely, VEGF stimulation induces the transcription of S1PR1 mRNA, and thus VEGF and S1P act in a feed-forward loop promoting the development of *de novo* blood vessels [44]. In the murine melanoma B16-F10 allograft model, neutralization of extracellular S1P with a monoclonal S1P antibody was associated with decreased tumor progression likely due to inhibition of VEGF- and bFGF-stimulated endothelial cell migration and angiogenesis [45]. Additionally, treatment of mice with the S1PR modulator FTY720, which renders cells unresponsive to S1P activation by sequestering S1PRs internally, reduced melanoma progression by inhibiting tumor vascularization [46]. Emerging evidence shows that S1P exerts both positive and negative effects on angiogenesis and vascular maturation, which are mediated by S1PR1 and S1PR2, respectively [47]. Consistent with these observations, B16BL6 murine melanoma cells implanted in S1PR2-null mice displayed increased tumor growth and angiogenesis with enhanced vascular mural cell recruitment, compared to wild-type mice [48]. These effects on angiogenesis bring the targeting of S1PRs into perspective as a novel anti-melanoma therapeutic approach.

4.2 Role of SIP in Fibroblast Differentiation

One of the key cellular components in the microsystem of the reactive stroma is the myofibroblast, also known as tumor-associated fibroblast (TAF), a modulated fibroblast that has acquired during stromagenesis the ability to express α -smooth muscle actin (α -SMA), fibroblast surface protein (FSP-1) or fibroblast-activated protein (FAP). TAFs also secrete growth factors, ECM components including collagen and fibronectin, and ECM modulating factors such as matrix metalloproteinases (MMPs) [49, 50]. Altogether, these microenvironmental factors promote the conversion of otherwise incipient tumor cells into highly malignant cells which can spread to and infiltrate distant organs, due to the acquisition of invasive and metastatic phenotypes [51]. Myofibroblasts are proposed to originate from various sources including pre-existing fibroblasts, preadipocytes, smooth muscle cells, endothelial cells, epithelial cells, and bone marrow-derived progenitors [52]. Whatever their origin, under the influence of afferent signals from cancer cells, they differentiate into myofibroblasts, thereby engaging a cycle of paracrine efferent signals, sensed by cancer cells which respond by changing their motility and aggressiveness [53].

In melanoma, the dense and fibrotic nature of the tumor is thought to be a direct consequence of the presence of myofibroblasts [54]. The recruitment and infiltration of large numbers of mesenchymal cells in the microenvironment of solid tumors is often associated with the development of high-grade cancers with poor prognosis [52]. Notably, the virulence of melanoma, assessed either by Clark levels [55] or the Breslow measurement of tumor thickness [56], has been conventionally related to the invasion by melanoma cells of the dermal fibroblast-rich layer of the skin. However, whereas the role of tumor-myofibroblast interactions in melanoma progression is increasingly documented [57], how dermal fibroblasts modulate this dialogue is less known. Recently, by using a 3D-coculture model in which preformed melanoma spheroids were implanted into a collagen matrix containing dermal fibroblasts, it has been shown that melanoma cells actively recruit normal fibroblasts [58]. This event could contribute to melanoma cell growth and resistance to treatment but the molecular mechanisms underlying these processes are not completely elucidated.

Interestingly, we identified SIP and its receptor S1PR3 as a critical signaling pathway in the dialogue between melanoma cells and dermal fibroblasts to mediate tumor cell invasion [21]. Indeed, the conditioned medium from SPHK1-expressing melanoma cells (as compared to SPHK1-null cells) led to the differentiation of skin fibroblasts into myofibroblasts with increased expression of MMP-2, MMP-9 and SPHK1, and the release of both proteases and SIP. These findings were recapitulated in TAFs, isolated from human melanoma biopsies, compared with dermal fibroblasts. Therefore, dysregulation of SIP production in melanoma cells elicits a fibrotic response in the tumor microenvironment, which in turn stimulates melanoma cell migration by promoting S1PR3 expression. Several studies have shown that SPHK1/SIP mediates differentiation of fibroblasts into myofibroblasts induced by pro-fibrotic factors in fibrotic diseases. For instance, TGF- β , a key cytokine of fibroblastic differentiation, stimulated SPHK1 expression and activity in dermal

[59] and cardiac [60] fibroblasts. Down-regulation of SPHK1 by siRNA abolished TGF- β -induced increases in α -SMA, laminin, TIMP-1 [59] and fibronectin [61], suggesting that SPHK1 is a downstream mediator of TGF- β signaling. Our recent data emphasize a new role for SPHK1/S1P signaling in fibroblastic differentiation in the context of skin cancer development.

In addition, in vivo tumorigenesis experiments showed that the lack of S1P in the microenvironment (as observed in *Sphk1*^{-/-} mice) prevented the growth of orthotopically injected murine melanoma cells [21]. Consistent with these observations, lung colonization of B16F10 melanoma cells, after tail vein injection, was lower in *Sphk1*^{-/-} mice than in control animals [62]. Both local tumor growth and dissemination were enhanced more efficiently by co-injection of wild-type skin fibroblasts than by fibroblasts from *Sphk1*^{-/-} mice [21]. Hence, these results show that melanoma invasiveness is critically dependent on S1P derived from host stromal cells. These findings also identify S1P in melanoma, derived from tumor cells, endothelial cells or TAFs and probably other cell types, as a novel therapeutic target.

5 Role of SLs on Melanoma Growth and Survival

Understanding the driving mutations, which contribute to melanomagenesis, has been crucial for the development of drugs that specifically target the underlying cellular signaling. Activating mutations of *RAS* have been detected in 15–20 % of melanomas, and almost exclusively involve the NRAS isoform. Mutations in the serine threonine kinase gene *BRAF* have been identified in 50–60 % of all metastatic melanomas, and 80–90 % of all *BRAF* mutations consist of an exchange of glutamine for valine at amino acid 600 (V600E) [63]. This genetic modification locks the kinase into a 500-fold more active conformation than wild-type BRAF and lead to constitutive activation of the MAPK pathway and ultimately to increased survival and growth. The efficacy and survival advantage of vemurafenib, which inhibits the mutant BRAF protein, over dacarbazine has been demonstrated in treatment-naïve patients with advanced BRAF V600E mutated melanoma [64]. However, in spite of a clear improvement, the PFS was still only 5.3 months (vemurafenib) compared to 1.6 months (dacarbazine). In 2013, dabrafenib, another inhibitor of mutant BRAF, and trametinib, which inhibits MEK1 and MEK2 proteins, were approved by the FDA for use as monotherapies in BRAF-mutant metastatic melanoma. Both treatments have shown benefit with a prolonged median PFS and overall survival compared with standard chemotherapy [65]. Combination of BRAF and MEK inhibitors appears to further improve PFS and overall survival [66].

Although BRAF represents one of the prime therapeutic targets in melanoma, both intrinsic and acquired resistance occurs following treatment with BRAF inhibitors; some patients do not respond to these agents while others have a short-lived response. Multiple changes within a given melanoma may contribute to this resistance [67, 68], and ongoing research tries to identify new therapeutic targets to overcome this resistance.

Among SLs, ceramide is well recognized as an important mediator of cell death in combination or not with other stresses such as radiation, chemotherapy, hypoxia, and nutrient deprivation [69]. As described above, melanoma cells develop numerous aberrations of SL metabolism that prevent the accumulation of ceramide, either by reducing its generation or enhancing its catabolism. Thanks to its central role in apoptosis, an increase of intracellular ceramide levels should result in attenuation of tumor growth and/or enhancement of drug sensitivity. This may be achieved through direct application of SLs or by the inhibition/activation of the enzymes that either produce or consume ceramide.

For instance, inhibition of SPHK1 by SKI-1 leads to increased ceramide levels, decreases S1P levels and is associated with inhibition of xenografted melanoma tumor growth [70]. Moreover, small interfering RNA knockdown of SPHK1 not only inhibits anchorage-dependent growth of human melanoma cells but also enhances sensitivity of these cells to apoptosis-inducing agents such as staurosporine. These events were linked to reduced levels of pAKT and CYCLIN D1 as well as increased expression of p21 and cleaved caspase-3 [70]. Consistent with these results, addition of nanoliposomal short-chain ceramide to human melanoma cells [71] or intracellular ceramide accumulation induced by cytotoxic drugs in B16 murine melanoma cells [72, 73], was associated with a significant inhibition of the pro-survival Akt signaling leading to the activation of the mitochondrial pathway of apoptosis. High levels of SPHK1 activity, associated to high expression of BCL-2, provide a cytoprotective effect by reducing the effects of ceramide on the mitochondrial outer membrane permeabilization [74]. The inhibitory effects of ceramide on melanoma cell growth were also reproduced by the use of natural compounds. Indeed, Jaspine B, an anhydrophytosphingosine derivative isolated from the marine sponge *Jaspis* sp., was described to trigger melanoma cell death through the inhibition of sphingomyelin synthase (SMS), an enzyme that converts de novo ceramide into the membrane lipid sphingomyelin [75].

Another well-documented example is the conversion of ceramide to GlcCer, catalyzed by GlcCer synthase (GCS). Indeed, inhibition of GlcCer synthesis, by the iminosugar *N*-butyldeoxynojirimycin or OGT2378, led to delayed or reduced murine melanoma development, respectively [76, 77]. Similarly, transfection of antisense GCS in MB4 murine melanoma cells was associated with reduction of cellular gangliosides and poor tumorigenic capacity when injected into mice [78]. Conversely, elevated expression of GCS was associated with cell survival in the etoposide-resistant human melanoma cell line MeWo [79].

In addition, we showed that GBA2, an enzyme capable of degrading GlcCer, may control A375 human melanoma cell growth likely through GlcCer degradation into ceramide leading to ER-stress and subsequent apoptosis of tumor cells [8].

A fundamental role both in melanoma progression and resistance to radiotherapy has been established for the proapoptotic enzyme acid SMase [17, 80]. Analysis of human specimens as well as of murine B16 melanoma cells has shown that, during melanoma progression, acid SMase expression decreases progressively with time, resulting in the generation of very aggressive cell clones, characterized by an increased ability to proliferate and to form metastases in vitro and, more importantly,

in vivo [17]. The mechanism responsible for acid SMase reduction and whether this event might be involved in the resistance to chemotherapy (especially to drugs known to involve acid SMase, e.g., cisplatin, doxorubicin, gemcitabine) needs further investigation, but these data suggest for the acid SMase pathway a clear potential in therapeutic perspective. In line with this area, data from Smith and Schuchman, showing for the first time that overexpression of acid SMase cDNA in melanoma cells, as well as the administration of the recombinant protein, can act in combination with irradiation in vitro and in vivo to induce cell death, suggests their possible use as antineoplastic agents [80].

In addition to acid SMase, acid ceramidase (acid CDase), the enzyme responsible for ceramide hydrolysis, appears to play an important role in cancer progression [81]. It played a key role in the response of human melanoma cells to the treatment with dacarbazine [82]. Indeed, using A375 human melanoma cells as a model, it was shown that dacarbazine triggers melanoma cell death, in part through the cathepsin-B mediated degradation of acid CDase and the ensuing increase of ceramide levels. These events lead to autophagy and loss of cell viability. Of importance, the modulation of the levels of acid CDase affected the sensitivity of cells to dacarbazine.

Taken together, these data suggest that the manipulation of the acid SMase/acid CDase axis, i.e., down-regulating the former and up-regulating the latter, might be considered a strategy that cancer cells utilize to reduce the levels of ceramide and thus to overcome its pro-apoptotic effects. From this point of view, it is worth speculating that genetic or therapeutic approaches aimed at restoring the appropriate levels of both enzymes may be useful in the treatment of melanoma by enhancing the efficacy of anticancer drugs.

Beside their direct effects on cancer cells, antitumoral strategies targeting SL metabolism could also impair melanoma progression by affecting the tumor micro-environment. Indeed, FTY720, which is known to interfere with S1P receptors and metabolism, leads to a decrease in CD4+Foxp3+ regulatory T cells and limits metastatic development when orally administered to syngeneic mice injected with B16F10-Nex2 melanoma cells [83]. Similarly, the peritumoral injection of a recombinant acid SMase to mice bearing B16-F10 melanoma tumors is associated to the killing of the surrounding microvascular endothelial cells leading to smaller tumors [80]. In this respect, also acid SMase expressed by the cells involved in the immune response against melanoma, i.e., dendritic cells, can be a suitable target for ameliorating the current therapeutic protocols. Indeed, pharmacological inhibition or genetic down-regulation of acid SMase in dendritic cells results in their survival within the tumor after cisplatin administration and consequently in the reduction of tumor growth [84].

Altogether, these results suggest that development of pharmacological agents targeting SL metabolism holds promise in the potentiation of anti-melanoma therapies. Table 1 summarizes aspects of SL metabolism, as well as known inhibitors of this pathway, that could be considered as potential agents and targets for improving therapeutic efficacy in the treatment of melanoma.

Table 1 In vitro and in vivo effects of SL analogues or (epi)genetic manipulation of SL metabolism on cell death and tumorigenicity of melanoma cells

Agents	Enzyme targeted	Combination therapy	Melanoma cell line	Biological effect	References
Mycocin	SPT		B16F10	Cell cycle arrest	[85, 86]
				Reduced tumor growth	
NB-DNJ	GCS		MEB4	Delayed tumor growth	[76]
OGT2378	GCS		MEB4	Reduced tumor growth	[77]
PDMP	GCS	Genistein	B16F10	Apoptosis	[73]
		Curcumin	WM-115, B16F10	Apoptosis	[87]
siRNA	GCS		MEB4	Reduced tumor growth	[78]
Jaspine B	SMS		SK-Mel28, B16F10	Apoptosis	[75, 88]
D-e-MAPP	CDase		M186, M221, A375, Mel2A	Apoptosis	[89]
D-NMAPPD					
SKI-II	SPHK1	Genistein	B16F10	Apoptosis	[73]
SKI-I	SPHK1		UACC 903	Reduced tumor growth	[70]
siRNA	SPHK1	Anti-CD95, C ₂ -ceramide	Mel-2a	Apoptosis	[74]
		Staurosporine	UACC 903	Apoptosis	[70]
siRNA	aSMase		B16F10	Increased tumor invasion	[17]
Recombinant protein	aSMase	Irradiation	B16F10	Reduced tumor growth	[80]
FTY720			B16F10-NEX2	Apoptosis	[83]
				Reduced tumor invasion	
C ₂ -ceramide		Curcumin	WM-115, B16F10	Apoptosis	[72]
		Genistein	B16F10	Apoptosis	[73]
Ceramide		Docetaxel	B16F10	Apoptosis	[90]
				Reduced tumor growth	
Nanoliposomes with C ₂ -ceramide		Sorafenib	UACC 903, 1205 Lu	Apoptosis	[71]
				Reduced tumor growth	
Nanovesicles with N-octanoyl-GlcCer		Doxorubicin	B16F10	Reduced tumor growth	[91]

CDase ceramidase, D-e-MAPP (1S,2R)-2-N-myristoylamino-1-phenyl-1-propanol, D-NMAPPD (1R,2R)-2-N-myristoylamino-1-(4-nitrophenyl)-1,3-propanediol, GCS glucosylceramide synthase, NB-DNJ N-butyldeoxynojirimycin, PDMP N-[2-hydroxy-1-(4-morpholinylmethyl)-2-phenylethyl]-decanamide, monohydrochloride, aSMase acid sphingomyelinase, SMS sphingomyelin synthase, SPHK1 sphingosine kinase 1, SPT serine palmitoyltransferase

B16F10 and MEB4 are murine melanoma cells; A375, 1205 Lu, M186, M221, Mel-2a, SK-Mel28, UACC 903 and WM-115 are human melanoma cells

6 Concluding Remarks

With the advent of targeted therapies, great progress has been made to improve the overall survival rate of patients with metastatic melanoma. However, long-term survivors of stage IV melanoma are still rare, and among patients whose tumors respond to targeted therapies, relapse is frequent. Significant efforts are currently being made, not only to further understand chemoresistance mechanisms but also to improve treatments with new drugs and rational use of combination therapy. Thanks to the wide spectrum of interconnection and interconversion possibilities in their metabolism, SLs supply to the cell a wide repertoire of potential targets that may control fine-tuning of signal transduction pathways. In melanoma cells, SL metabolism is dysregulated and some species are able to control key molecular steps of melanoma progression such as tumor cell growth and survival. Moreover, S1P and gangliosides act on the remodeling of the stroma cells surrounding melanoma cells, which in turn, facilitate tumor invasion (Fig. 1).

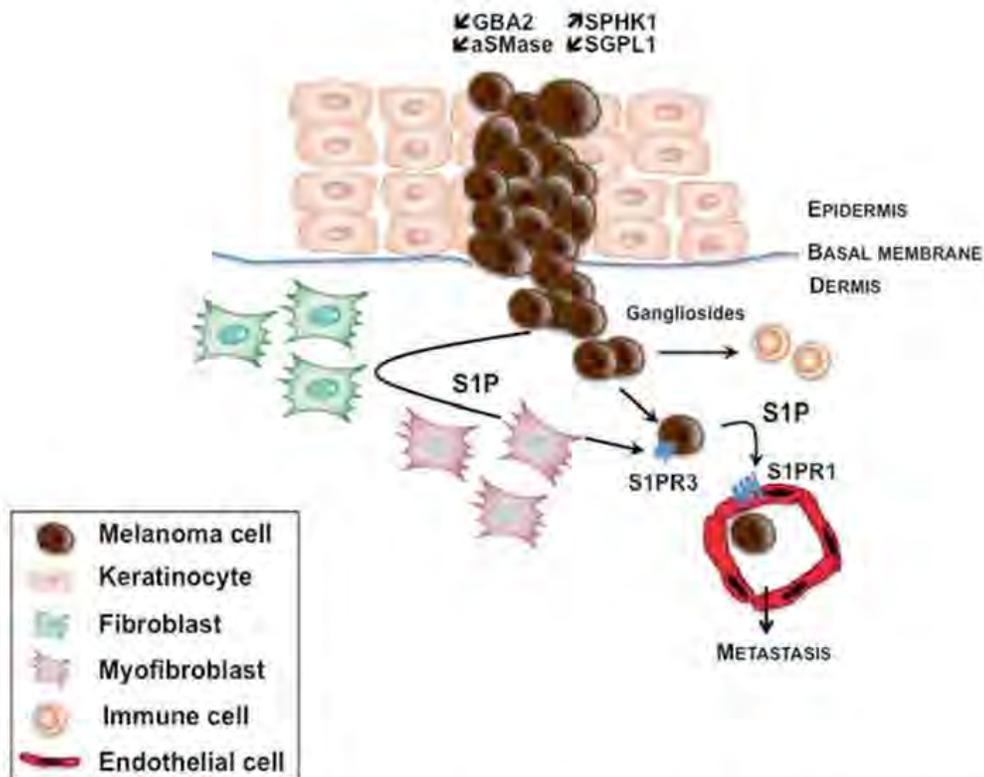


Fig. 1 Role of sphingolipids in melanoma. The figure summarizes how SL metabolism is affected in melanoma cells and how SLs could modulate melanoma progression. *aSMase* acid sphingomyelinase, *CDase* ceramidase, *GBA2* β -glucocerebrosidase 2, *SPHK1* sphingosine kinase 1, *S1P* sphingosine 1-phosphate, *S1PR* sphingosine 1-phosphate receptor

Some unmet challenges include deciphering the mechanisms that control the dysregulations of SL metabolism in melanoma cells as well as the identification and the role of the different molecular species in the multi-step process of melanomagenesis. Finally, targeting SL metabolism could be a promising area in the development of new drugs to halt melanoma progression and overcome the resistance towards recently targeted therapies.

Acknowledgements Financial support by INSERM, Paul Sabatier University, Ligue Nationale Contre le Cancer (Équipe Labellisée 2013), the Italian Association of Cancer Research (AIRC, IG11365) and the French and Lebanese ministries of foreign affairs (MAEDI) and Higher Education and Research (MENESR) (PHC CEDRE, 30750VL) is gratefully acknowledged. D.G. is a recipient of a fellowship from Ligue Nationale Contre le Cancer.

References

1. MacKie RM, Hainschild A, Eggermont AM (2009) Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol* 20(Suppl 6):vi1–vi7
2. Nikolaou V, Stratigos AJ (2014) Emerging trends in the epidemiology of melanoma. *Br J Dermatol* 170:11–19
3. Flaherty K (2010) Advances in drug development. BRAF validation in melanoma. *Clin Adv Hematol Oncol* 8:31–34
4. Graziani G, Tentori L, Navarria P (2012) Ipilimumab: a novel immunostimulatory monoclonal antibody for the treatment of cancer. *Pharmacol Res* 65:9–22
5. Solit DB, Rosen N (2011) Resistance to BRAF inhibition in melanomas. *N Engl J Med* 364:772–774
6. Rabionet M, Gorgas K, Sandhoff R (2014) Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochim Biophys Acta* 1841:422–434
7. Elias PM, Gruber R, Cunniffe D et al (2014) Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE). *Biochim Biophys Acta* 1841:314–318
8. Sorli SC, Colie S, Albinet V et al (2013) The nonlysosomal beta-glucosidase GBA2 promotes endoplasmic reticulum stress and impairs tumorigenicity of human melanoma cells. *FASEB J* 27:489–498
9. Landgren O, Turesson I, Gridley G et al (2007) Risk of malignant disease among 1525 adult male US Veterans with Gaucher disease. *Arch Intern Med* 167:1189–1194
10. Taddei TH, Kacena KA, Yang M et al (2009) The underrecognized progressive nature of N370S Gaucher disease and assessment of cancer risk in 403 patients. *Am J Hematol* 84:208–214
11. Naumova E, Mihaylova A, Ivanova M et al (2007) Impact of KIR/HLA ligand combinations on immune responses in malignant melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 56:95–100
12. Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO et al (2009) Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 361:1651–1661
13. Pan T, Li X, Jankovic J (2011) The association between Parkinson's disease and melanoma. *Int J Cancer* 128:2251–2260
14. Ron I, Rapaport D, Horowitz M (2010) Interaction between parkin and mutant glucocerebrosidase variants: a possible link between Parkinson disease and Gaucher disease. *Hum Mol Genet* 19:3771–3781
15. Amos CI, Wang LE, Lee JE et al (2011) Genome-wide association study identifies novel loci predisposing to cutaneous melanoma. *Hum Mol Genet* 20:5012–5023

16. Xu X, Liu B, Zou P et al (2014) Silencing of LASS2/TMSG1 enhances invasion and metastasis capacity of prostate cancer cell. *J Cell Biochem* 115:731–743
17. Bizzozero L, Cazzato D, Cervia D et al (2014) Acid sphingomyelinase determines melanoma progression and metastatic behaviour via the microphthalmia-associated transcription factor signalling pathway. *Cell Death Differ* 21:507–520
18. Haqq C, Nosrati M, Sudilovsky D et al (2005) The gene expression signatures of melanoma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6092–6097
19. Talantov D, Mazumder A, Yu JX et al (2005) Novel genes associated with malignant melanoma but not benign melanocytic lesions. *Clin Cancer Res* 11:7234–7242
20. Colie S, Van Veldhoven PP, Kodjovar B et al (2009) Disruption of sphingosine 1-phosphate lyase confers resistance to chemotherapy and promotes oncogenesis through Bcl-2/Bcl-x1 upregulation. *Cancer Res* 69:9346–9353
21. Albinet V, Bats ML, Huwiler A et al (2014) Dual role of sphingosine kinase-1 in promoting the differentiation of dermal fibroblasts and the dissemination of melanoma cells. *Oncogene* 33:3364–3373
22. Rebecca VW, Sondak VK, Smalley KS (2012) A brief history of melanoma: from mummies to mutations. *Melanoma Res* 22:114–122
23. Carr A, Mullet A, Mazorra Z et al (2000) A mouse IgG1 monoclonal antibody specific for N-glycolyl GM3 ganglioside recognized breast and melanoma tumors. *Hybridoma* 19:241–247
24. Nicolae I, Nicolae CD, Coman OA et al (2011) Serum total gangliosides level: clinical prognostic implication. *Rom J Morphol Embryol* 52:1277–1281
25. Costin GE, Hearing VJ (2007) Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J* 21:976–994
26. Gupta PB, Kuperwasser C, Brunet JP et al (2005) The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat Genet* 37:1047–1054
27. Koludrovic D, Davidson I (2013) MITF, the Janus transcription factor of melanoma. *Future Oncol* 9:235–244
28. Saha B, Singh SK, Sarkar C et al (2006) Transcriptional activation of tyrosinase gene by human placental sphingolipid. *Glycoconj J* 23:259–268
29. Saha B, Singh SK, Mallick S et al (2009) Sphingolipid-mediated restoration of Mitf expression and repigmentation in vivo in a mouse model of hair graying. *Pigment Cell Melanoma Res* 22:205–218
30. Singh SK, Sarkar C, Mallick S et al (2005) Human placental lipid induces melanogenesis through p38 MAPK in B16F10 mouse melanoma. *Pigment Cell Res* 18:113–121
31. Mallick S, Singh SK, Sarkar C et al (2005) Human placental lipid induces melanogenesis by increasing the expression of tyrosinase and its related proteins in vitro. *Pigment Cell Res* 18:25–33
32. Kim DS, Hwang BS, Lee JE et al (2003) Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation. *J Cell Sci* 116:1699–1706
33. Kim DS, Park SH, Jeong YM et al (2011) Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via microphthalmia-associated transcription factor phosphorylation through the SIP3 receptor subtype. *J Pharm Pharmacol* 63:409–416
34. Brandner JM, Haass NK (2013) Melanoma's connections to the tumour microenvironment. *Pathology* 45:443–452
35. Botù G, Cerrone M, Scognamiglio G et al (2013) Microenvironment and tumor progression of melanoma: new therapeutic perspectives. *J Immunotoxicol* 10:235–252
36. Takabe K, Spiegel S (2014) Export of Sphingosine-1-Phosphate and Cancer Progression. *J Lipid Res* 55:1839–1846
37. Claffey KP, Brown LF, del Aguila LF et al (1996) Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis. *Cancer Res* 56:172–181

38. Rodeck U, Becker D, Herlyn M (1991) Basic fibroblast growth factor in human melanoma. *Cancer Cells* 3:308–311
39. Pomyje J, Zivny JH, Stopka T et al (2001) Angiopoietin-1, angiopoietin-2 and Tie-2 in tumour and non-tumour tissues during growth of experimental melanoma. *Melanoma Res* 11:639–643
40. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57–70
41. Ugurel S, Rappel G, Tilgen W et al (2001) Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival. *J Clin Oncol* 19:577–583
42. Giatromanolaki A, Sivridis E, Kouskoukis C et al (2003) Hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α are related to vascular endothelial growth factor expression and a poorer prognosis in nodular malignant melanomas of the skin. *Melanoma Res* 13:493–501
43. Pastushenko I, Vermeulen PB, Van den Eynden GG et al (2014) Mechanisms of tumour vascularisation in cutaneous malignant melanoma: clinical implications. *Br J Dermatol* 171:220–233
44. Yester JW, Tizazu E, Harikumar KB et al (2011) Extracellular and intracellular sphingosine-1-phosphate in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 30:577–597
45. Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ et al (2006) Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell* 9:225–238
46. LaMontagne K, Littlewood-Evans A, Schnell C et al (2006) Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization. *Cancer Res* 66:221–231
47. Takuwa Y, Du W, Qi X et al (2010) Roles of sphingosine-1-phosphate signaling in angiogenesis. *World J Biol Chem* 1:298–306
48. Du W, Takuwa N, Yoshioka K et al (2010) S1P(2), the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, negatively regulates tumor angiogenesis and tumor growth in vivo in mice. *Cancer Res* 70:772–781
49. Kalluri R, Zeisberg M (2006) Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:392–401
50. Cirri P, Chiarugi P (2011) Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 31:195–208
51. Joyce JA, Pollard JW (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9:239–252
52. Shimoda M, Melody KT, Orimo A (2010) Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin Cell Dev Biol* 21:19–25
53. Kunz-Schughart LA, Knuechel R (2002) Tumor associated fibroblasts (part I): active stromal participants in tumor development and progression? *Histol Histopathol* 17:599–621
54. Ruiter D, Bogenrieder T, Elder D et al (2002) Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. *Lancet Oncol* 3:35–43
55. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D et al (1989) Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 81:1893–1904
56. Breslow A (1970) Thickness, cross-sectional areas and depth invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 172:902–908
57. Smalley KS, Liomi M, Herlyn M (2005) Targeting the stromal fibroblasts: a novel approach to melanoma therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 5:1069–1078
58. Flach EH, Rebecca VW, Herlyn M et al (2011) Fibroblasts contribute to melanoma tumor growth and drug resistance. *Mol Pharm* 8:2039–2049
59. Yamanaka M, Shegogue D, Pei H et al (2004) Sphingosine kinase 1 (SPHK1) is induced by transforming growth factor-beta and mediates TIMP-1 up-regulation. *J Biol Chem* 279:53994–54001
60. Gellings-Lowe N, Swaney JS, Moreno KM et al (2009) Sphingosine-1-phosphate and sphingosine kinase are critical for transforming growth factor-beta-stimulated collagen production by cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 82:303–312

61. Kono Y, Nishiuma T, Nishimura Y et al (2007) Sphingosine kinase 1 regulates differentiation of human and mouse lung fibroblasts mediated by TGF-beta1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37:395-404
62. Ponnusamy S, Selvam SP, Mehrotra S et al (2012) Communication between host organism and cancer cells is transduced by systemic sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signaling to regulate tumour metastasis. *EMBO Mol Med* 4:761-775
63. Davies H, Bignell GR, Cox C et al (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949-954
64. Chapman PB, Hauschild A, Robert C et al (2011) Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 364:2507-2516
65. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV et al (2012) Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 380:358-365
66. Voskoboinik M, Arkenau HT (2014) Combination Therapies for the Treatment of Advanced Melanoma: A Review of Current Evidence. *Biochem Res Int* 2014:307059
67. Nazarian R, Shi H, Wang Q et al (2010) Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 468:973-977
68. Sun C, Wang L, Huang S et al (2014) Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature* 508:118-122
69. Hannun YA, Obeid LM (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:139-150
70. Madhumapantula SV, Hengst J, Gowda R et al (2012) Targeting sphingosine kinase-1 to inhibit melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 25:259-274
71. Tran MA, Smith CD, Kester M et al (2008) Combining nanoliposomal ceramide with sorafenib synergistically inhibits melanoma and breast cancer cell survival to decrease tumor development. *Clin Cancer Res* 14:3571-3581
72. Yu T, Li J, Sun H (2010) C6 ceramide potentiates curcumin-induced cell death and apoptosis in melanoma cell lines in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol* 66:999-1003
73. Ji C, Yang YL, He L et al (2012) Increasing ceramides sensitizes genistein-induced melanoma cell apoptosis and growth inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 421:462-467
74. Bektas M, Jolly PS, Muller C et al (2005) Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression. *Oncogene* 24:178-187
75. Salma Y, Lafont E, Therville N et al (2009) The natural marine anhydrophytosphingosine, Jaspine B, induces apoptosis in melanoma cells by interfering with ceramide metabolism. *Biochem Pharmacol* 78:477-485
76. Guerrero M, Ladisch S (2003) N-butyldeoxyjirimycin inhibits murine melanoma cell ganglioside metabolism and delays tumor onset. *Cancer Lett* 201:31-40
77. Weiss M, Hettner S, Smith P et al (2003) Inhibition of melanoma tumor growth by a novel inhibitor of glucosylceramide synthase. *Cancer Res* 63:3654-3658
78. Deng W, Li R, Guerrero M et al (2002) Transfection of glucosylceramide synthase antisense inhibits mouse melanoma formation. *Glycobiology* 12:145-152
79. Gouaze V, Yu JY, Bleicher RJ et al (2004) Overexpression of glucosylceramide synthase and P-glycoprotein in cancer cells selected for resistance to natural product chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 3:633-639
80. Smith EL, Schuchman EH (2008) Acid sphingomyelinase overexpression enhances the anti-neoplastic effects of irradiation in vitro and in vivo. *Mol Ther* 16:1565-1571
81. Truman JP, Garcia-Barros M, Obeid LM et al (2014) Evolving concepts in cancer therapy through targeting sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1841:1174-1188
82. Bedia C, Casas J, Andrieu-Abadie N et al (2011) Acid ceramidase expression modulates the sensitivity of A375 melanoma cells to dacarbazine. *J Biol Chem* 286:28200-28209
83. Pereira FV, Arruda DC, Figueiredo CR et al (2013) FTY720 induces apoptosis in B16F10-NEX2 murine melanoma cells, limits metastatic development in vivo, and modulates the immune system. *Clinics (Sao Paulo)* 68:1018-1027

84. Perrotta C, Bizzozero L, Falcone S et al (2007) Nitric oxide boosts chemoinmuno-therapy via inhibition of acid sphingomyelinase in a mouse model of melanoma. *Cancer Res* 67: 7559–7564
85. Lee YS, Choi KM, Lee S et al (2012) Myriocin, a serine palmitoyltransferase inhibitor, suppresses tumor growth in a murine melanoma model by inhibiting de novo sphingolipid synthesis. *Cancer Biol Ther* 13:92–100
86. Lee YS, Choi KM, Choi MH et al (2011) Serine palmitoyltransferase inhibitor myriocin induces growth inhibition of B16F10 melanoma cells through G(2)/M phase arrest. *Cell Prolif* 44:320–329
87. Yu T, Li J, Qiu Y et al (2012) 1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (PDMP) facilitates curcumin-induced melanoma cell apoptosis by enhancing ceramide accumulation, JNK activation, and inhibiting PI3K/AKT activation. *Mol Cell Biochem* 361:47–54
88. Salma Y, Ballereau S, Maaliki C et al (2010) Flexible and enantioselective access to Jaspine B and biologically active chain-modified analogues thereof. *Org Biomol Chem* 8:3227–3243
89. Raisöva M, Goltz G, Bektas M et al (2002) Bcl-2 overexpression prevents apoptosis induced by ceramidase inhibitors in malignant melanoma and HaCaT keratinocytes. *FEBS Lett* 516:47–52
90. Feng LX, Li M, Liu YJ et al (2014) Synergistic enhancement of cancer therapy using a combination of ceramide and docetaxel. *Int J Mol Sci* 15:4201–4220
91. van Lummel M, van Blitterswijk WJ, Vink SR et al (2011) Enriching lipid nanovesicles with short-chain glucosylceramide improves doxorubicin delivery and efficacy in solid tumors. *FASEB J* 25:280–289

ANNEXE 2: Revue



Review

Monogenic neurological disorders of sphingolipid metabolism[☆]Frédérique Sabourdy^{a,b,c}, Leonardo Astudillo^{a,b,d}, Céline Colacios^{a,b}, Patricia Dubot^e, Marguerite Mrad^{a,b}, Bruno Séguin^{a,b}, Nathalie Andrieu-Abadie^{a,b}, Thierry Levade^{a,b,c,d}^a Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR1037, Toulouse, France^b Equipe Libellule Ligue Nationale Contre le Cancer 2013, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRET), Université de Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France^c Laboratoire de Biochimie Métabolique, Institut Fédératif de Biologie, CHU Purpan, Toulouse, France^d Service de Médecine Interne, CHU Purpan, Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 November 2014

Received in revised form 10 January 2015

Accepted 12 January 2015

Available online 7 February 2015

Keywords:

Ceramide

Genetic defects

Sphingolipidosis

Gaucheride

Glycolipid

Central nervous system

ABSTRACT

Sphingolipids comprise a wide variety of molecules containing a sphingoid long-chain base that can be N-acylated. These lipids are particularly abundant in the central nervous system, being membrane components of neurons as well as non-neuronal cells. Direct evidence that these brain lipids play critical functions in brain physiology is illustrated by the dramatic consequences of genetic disturbances of their metabolism. Inherited defects of both synthesis and catabolism of sphingolipids are now identified in humans. These monogenic disorders are due to mutations in the genes encoding for the enzymes that catalyze either the formation or degradation of simple sphingolipids such as ceramides, or complex sphingolipids like glycolipids. They cause varying degrees of central nervous system dysfunction, quite similarly to the neurological disorders induced in mice by gene disruption of the corresponding enzymes. Herein, the enzyme deficiencies and metabolic alterations that underlie these diseases are reviewed. Their possible pathophysiological mechanisms and the functions played by sphingolipids one can deduce from these conditions are discussed. This article is part of a Special Issue entitled Brain Lipids.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Sphingolipids as critical brain constituents

Sphingolipids (SLs) represent one major category of lipids [1], being present in all mammalian cells and lipoproteins. This complex and diverse family of lipid molecules share a common backbone formed by a long-chain sphingoid base. N-acylation of this sphingoid base results in the formation of ceramide. Addition of a phosphate (or a phosphate linked to choline or ethanolamine), galactose or glucose headgroup at the C1 position leads to the formation of the major complex SL classes, i.e., phosphosphingolipids, galactosphingolipids, and glucosylceramide (GlcCer)-based glycosphingolipids, respectively. Since the pioneering studies of the ‘‘brain chemist’’ J.L.W. Thudichum 130 years ago, and as reflected by the name of some of these lipids, SLs are recognized as abundant elements of the nervous system (though present in all cell types). Indeed, among total human brain lipids (which represent approximately half of the dry weight of the brain), sphingomyelin (SM) accounts for about 15% of total phospholipids and galactocerebroside for about 15% of total lipids, both of these SLs being even more abundant

in the white matter [2]. Together with cholesterol, galactolipids and SM represent major lipids of myelin.

The importance of SLs in the nervous system not only stems from their tissue concentrations but also (mainly) from their biological functions. Convincing evidence has accumulated during the last two decades that various SL molecules are bioactive lipids regulating numerous physiological functions, including neural cell apoptosis, differentiation and repair, dendritogenesis and neurotransmitter release (for reviews, see [3–7]). Table 1 gives some examples of the biological effects that SL molecules can mediate on brain cells. The importance of SLs in brain development and homeostasis is illustrated by the alterations that arise from dysfunctional SL metabolism. Neurological and psychiatric disorders have been associated with abnormal metabolism of different SL molecules: such conditions include neurodegenerative, autoimmune, ischemic disorders, aging, and brain tumors (for reviews, see [3,8–10]). However, the most compelling evidence that SLs are critical players for the functions of the nervous system is undoubtedly a series of genetic disorders that directly affect SL metabolism. These disorders are briefly presented below.

2. Overview of sphingolipid metabolism

SLs are amphipathic lipids that typically reside within cellular membranes. The simplest one is ceramide (as a molecule resulting from the condensation of a fatty acid and the sphingoid base, it fits with the classical definition of a lipid). Ceramide (Cer) is formed from

Abbreviations: Cer, ceramide; CNS, central nervous system; ER, endoplasmic reticulum; GlcCer, galactosylceramide; GlcSph, glucosylceramide; MRI, magnetic resonance imaging; SL, sphingolipid; SM, sphingomyelin.

[☆] This article is part of a Special Issue entitled Brain Lipids.

Corresponding author at: INSERM UMR1037, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRET), 2 Avenue Hubert Curien, CS33757, 31037 Toulouse Cedex 1, France. Tel.: +33 5 62 74 16 19.

E-mail address: thierry.levade@inserm.fr (T. Levade).

Table 1
Examples of brain functions regulated by sphingolipids.

bioactive SL molecule	Cell type or cell line	Biological effects	Ref
Sphingosine 1-phosphate (S1P)	Rat hippocampal neurons	Apoptosis	[155]
	Rat embryo astrocytes	Proliferation and production of GDNF	[156]
	Mouse cortical astrocytes	Secretion of NGF	[157]
	Human glioblastoma	Proliferation	[158]
	Human umbilical vein endothelial cells	Induction of angiogenesis by glioma-derived S1P	[159]
	Rat neural progenitor cells Rat hypothalamus POMC neurons	Migration Reduction of food consumption and increase in energy expenditure	[160] [161]
Sphingosylphosphocholine (lyso-sphingomyelin)	Human glioma stem-like cells	Proliferation and stemness	[162]
	Bovine middle cerebral artery	Vasodilation	[163]
	Rat hippocampal (CA1 and CA3) neurons	Protection from behavioral aberrations and neuronal degeneration	[164]
Sphingosine	Rat embryo cerebral cortical neurons and mouse hippocampal cell line	Increased synaptic contacts, cell proliferation and clustering	[165]
	Rat primary cortical astrocytes	Release of glutamate and THF	[166]
	Rat pituitary cells	Inhibition of voltage-activated calcium channels	[167]
Psychosine (galactosylsphingosine)	Rat embryo hippocampal neurons and astrocytes	Apoptosis	[168]
	Rat hippocampal CA3 neurons	Protection from neuronal degeneration	[169]
	Rat glioma	Apoptosis	[170]
	Mouse oligodendrocyte progenitor cells	Apoptosis by activation of caspases-8, 9 and 3	[171]
	Mouse cortical neurons	Inhibition of fast axonal transport	[172]
Glycosylsphingosine	Human oligodendrocyte progenitor-like cells and primary rat oligodendrocyte progenitor cells	Inhibition of differentiation and survival	[173]
	Rat brain microtubules	Ryanodine receptor-independent calcium mobilization	[174]
	Human cholinergic neuron-like cells	Toxicity	[175]
Ceramide	Mouse neuroblastoma	Inhibition of cell proliferation and stimulation of neurite outgrowth	[176]
	Rat glioma	Apoptosis	[177]
	Neonatal rat brain	Protection from hypoxic-ischemic injury	[178]
	Human glioma	Inhibition of proliferation and induction of autophagic cell death	[179,180]
2-hydroxy ceramide Glycosylceramide	Rat cerebral vessels	Vasodilation and leukocyte-endothelial interactions	[181]
	Mouse hippocampus	Depressive-like behavior	[182]
	Rat glioma	Apoptosis	[183]
GM1	Rat brain microtubules	Ryanodine receptor-dependent calcium mobilization	[184]
	Neonatal rat cerebellar and cortical neurons	Protection against glutamate and kainate neurotoxicity	[185]
GM2	Rat distal synaptosomes	Modulation of the high affinity dopamine uptake	[186]
	Rat hippocampal neurons	Regulation of AMPA receptor trafficking	[187]
	Feline, canine and ovine cortical pyramidal neurons	Dendriteogenesis	[188]

Abbreviations: AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor; NGF, nerve growth factor; POMC, pro-opiomelanocortin; THF, tumor necrosis factor.

smaller lipidic molecules and can be converted to structurally more complex lipids; its degradation leads to the release of simpler molecules. Cer can thus be viewed as a central metabolite in SL metabolism (Fig. 1).

In mammalian cells, Cer biosynthesis starts with the condensation of a long-chain fatty acyl-CoA, usually palmitoyl-CoA, with L-serine, followed by a reduction to produce the saturated sphingoid base sphinganine. Addition by ceramide synthases of an acyl-CoA to sphinganine through an amide bond leads to dihydroceramide, which can be desaturated to form Cer. Whereas all these enzymatic steps occur at the cytosolic surface of the endoplasmic reticulum (ER), further metabolism of Cer takes place in other subcellular compartments except its conversion to β -galactosylceramide (GalCer) and ceramide-phosphoethanolamine, which operates on the luminal side of the ER. Of note, the fatty acyl-CoA used for GalCer synthesis is often 2-hydroxylated as a result of the action of the *FA2H* gene product.

After transport to the Golgi apparatus, Cer can be phosphorylated (to generate ceramide 1-phosphate, a pro-inflammatory mediator), or converted to ceramide-phosphocholine (sphingomyelin, SM) or β -glucosylceramide (GlcCer). At the luminal surfaces of the Golgi and trans-Golgi network, GlcCer gets transformed to numerous glycosphingolipids by stepwise addition of monosaccharides and sialic acid residues (Fig. 1; see [11,12]). The presence of a given glycolipid profile at the cell surface depends on brain cell type and region, changes during ontogenesis and under pathological conditions. The four major

gangliosides found in adult brain include GM1, GD1a, GD1b and GT1b (see [13,14]).

Degradation of complex SLs occurs in distinct subcellular compartments. While breakdown of cell surface SM and glycolipids at the level of the plasma membrane may be activated upon certain signals, catabolism in the endosomal/lysosomal system appears to be constitutive and represents the major pathway. The latter allows recycling of plasma membrane constituents after endocytosis (and other membranes by autophagy) through sequential removal of the hydrophilic headgroup components of SLs [note that some glycosphingolipids that are internalized can directly recycle to the plasma membrane or be transported via endosomal vesicles to the Golgi for additional glycosylation [15]]. The lysosomal catabolic pathway is catalyzed by specific hydrolases, likely acting on small intra-endolysosomal vesicles [16]. Degradation of some SLs requires the intervention of so-called activators, i.e., saposins and the GM2 activator. The final step of lysosomal digestion of all SLs is the cleavage of Cer by acid ceramidase, which releases a fatty acid and sphingosine. This sphingosine, as well as that arising from the breakdown of ceramide in other compartments, can either be "recycled" by *N*-acylation (via ceramide synthases) or phosphorylated. The resulting sphingosine 1-phosphate (S1P) is a potent lipid mediator, which can be dephosphorylated or irreversibly degraded into products that are reused for glycerophospholipid metabolism.

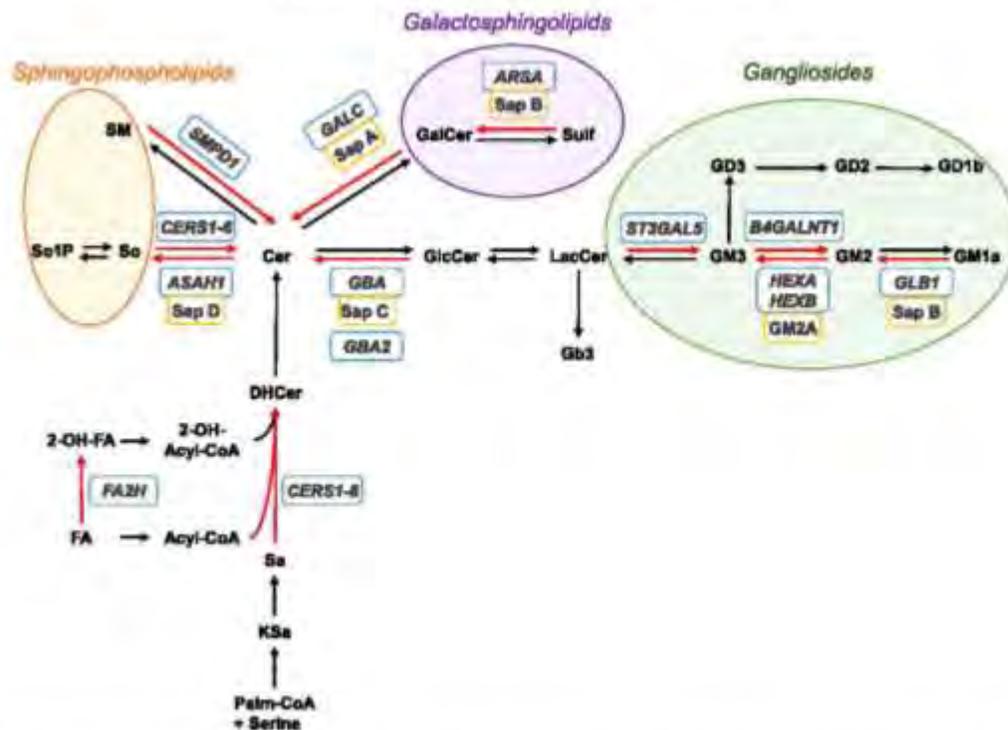


Fig. 1. Simplified pathways of sphingolipid metabolism. The pathways that operate in human brain are depicted. Only the genes of the enzymes (and cofactors) that are mutated in human brain disorders are indicated (this is why, for instance, genetic defects of the first, rate-limiting step of SL biosynthesis are not underlined here as they cause a peripheral neuropathy; similarly, the gene encoding α -galactosidase A (the cleaves Gb3) is not highlighted here as the corresponding disease can manifest as a cerebrovascular disease and small fiber peripheral neuropathy). Defective pathways are denoted as red arrows. The *de novo* pathway for the production of ceramide starts by the condensation of serine and palmitoyl-CoA. Then, dihydroceramide is formed by addition of an acyl-CoA (or a 2-hydroxyacyl-CoA) to sphingosine. Desaturation of dihydroceramide produces ceramide. Ceramide can then be converted to (i) the main sphingophospholipid sphingomyelin, (ii) galactose-containing sphingolipids, or (iii) glycosphingolipids, including gangliosides. Ceramide can also be degraded by ceramidases, releasing sphingosine and fatty acid. Abbreviations: Cer, ceramide; DHCer, dihydroceramide; FA, fatty acid; GalCer, β -galactosylceramide; Gb3, globotriaosylceramide (α -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucosyl-(1 \rightarrow 3)-ceramide); GD3, β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 3)-N-acetyl- β -D-galactosaminyl-(1 \rightarrow 4)-[α -N-acetylneuraminyl-(2 \rightarrow 8)- α -N-acetylneuraminyl-(2 \rightarrow 3)]- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucosyl-(1 \rightarrow 3)-ceramide; GD2, N-acetyl- β -D-galactosaminyl-(2 \rightarrow 8)-[α -N-acetylneuraminyl-(2 \rightarrow 3)]- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucosyl-(1 \rightarrow 3)-ceramide; GD1b, N-acetylneuraminyl-(2 \rightarrow 8)-[α -N-acetylneuraminyl-(2 \rightarrow 3)]- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucosyl-(1 \rightarrow 3)-ceramide; GlicCer, β -glucosylceramide; GM1a, β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 3)-N-acetyl- β -D-galactosaminyl-(1 \rightarrow 4)-[α -N-acetylneuraminyl-(2 \rightarrow 3)]- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucosyl-(1 \rightarrow 3)-ceramide; GM2, N-acetyl- β -D-galactosaminyl-(1 \rightarrow 4)-[α -N-acetylneuraminyl-(2 \rightarrow 3)]- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucosyl-(1 \rightarrow 3)-ceramide; GM3, N-acetyl- β -D-galactosaminyl-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucosyl-(1 \rightarrow 3)-ceramide; KSA, ketosphingosine; LacCer, lactosylceramide (β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucosyl-(1 \rightarrow 3)-ceramide); Palm-CoA, palmitoyl-CoA; Sa, sphingosine; Ser, serine; SM, sphingomyelin; So, sphingosine; SoP, sphingosine-1-phosphate; Sulf, sulfide (3-O-sulfid- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 3)-ceramide).

A number of human inherited defects of SL metabolism are known, some of which have been identified very recently. We will describe here only those that affect the central nervous system (CNS), and especially the brain [so that disorders that involve the peripheral nervous system (e.g., hereditary sensory autonomic neuropathy 1) or the retina will not be described]. The major neurological features of these diseases are presented in Table 2. In an attempt to get insights into the (patho)physiological functions of SLs in the brain, the genetic defects are presented below according to the main SL whose level or metabolic pathway is perturbed by the inborn error.

3. Defects of ceramide metabolism

As stated above, Cer can be viewed at the crossroads of all SL metabolic routes. Here, we will consider defects of its biosynthesis and its catabolism.

3.1. Defects in ceramide synthases

The backbone of SLs, Cer, exhibits an amazing structural diversity. Not only the sphingoid base structure can vary (e.g., C18 or C20) but also the fatty acid moiety can be diverse: brain SLs contain fatty acids ranging from C14 to C26: they are saturated or unsaturated,

non-hydroxylated or 2-hydroxylated. Six distinct human ceramide synthases, encoded by the *CERS* genes, have been identified. These enzymes exhibit both tissue-specificity and specificity for the acyl-CoA substrate [17–20]. Two human neurological disorders have been associated with *CERS* mutations.

A homozygous substitution (p.H183Q) in Cer synthase 1 (*CERS1*) has just been identified in an Algerian family [21]. The affected members presented with myoclonic epilepsy and cognitive decline up to dementia. This autosomal recessive condition is likely due to the inability of the mutant enzyme to use C18:0 and C18:1-CoAs, i.e., the preferred substrates of this ceramide synthase isoform expressed in the brain, to synthesize C18:0 and C18:1-(dihydro)ceramides. A pathophysiological mechanism proposed by the authors of this report is the activation of an ER stress response by reduced *CERS1* expression, which may subsequently underlie neurodegeneration. Quite in line with the observations in the human patients, disruption of *Cers1* in mice results in an ataxic phenotype related to Purkinje cell death [22,23]. In these mutant animals, the brain levels of C18:0 and C18:1-ceramides (as well as gangliosides) were reduced while the levels of sphingoid bases and phosphorylated sphingoid bases were increased.

The case of an adult male patient harboring a *CERS2* defect has also recently been reported [24]. His clinical picture was dominated by progressive myoclonic epilepsy. Interestingly, this patient carries a

Table 2

Human genetic defects of sphingolipid metabolism in the CNS

Disease name	Enzyme/protein	Gene	Brain lipid alteration ^a	Main (neurological) symptoms
No specific name	Ceramide synthase 1	CSF1	In Cer1-deficient mice: reduced C18:0 and C18:1-Cer but increased C16:0-Cer, decreased SM and hexosylceramides; increased sphingoid bases and phosphorylated sphingoid bases	Myoclonic epilepsy, progressive cognitive deterioration
No specific name	Ceramide synthase 2	CSF2	In patient's skin fibroblasts: reduced C24 to C26-Cer (and SM), moderately increased C16 and C18-Cer	Late-onset, progressive myoclonic epilepsy
Fabry	Acid ceramidase	ASH1	Increased non-hydroxy and 2-hydroxy-Cer	Painful joints, valvulocoronary nodules, hoarseness, hepatomegaly, seizures, mental and motor progressive deterioration Variant form: spinal muscular atrophy with progressive myoclonic epilepsy
Niemann-Pick type A	Acid sphingomyelinase	SMPD1	Increased SM and SP	Early onset, hepatosplenomegaly, hypotonia, failure to thrive, loss of motor function and deterioration of intellectual capabilities
Specific paraplegia 25	Fatty acid 2-hydroxylase	FACH	In fetal fibroblasts: decreased 2-hydroxy-glucosylipids but elevated non-hydroxy GalCer	Onset after 3 years: progressive orthopyramidal syndrome, spastic paraplegia, gait disturbance, dystonia, late mental deterioration, possible dyspraxia, dysmetria and seizures
Krabbe	D-Galactosyl-ceramidase	GALC	Increased GalCer in macrophages and microglia; increased psychosine	Typical early onset form: irritability, progressive spasticity, developmental regression, blindness, deafness, myoclonic seizures
Metachromatic leukodystrophy	Arylsulfatase A	ARSA	Accumulation of sulfatides and lysa-sulfatides in myelin-producing cells and myelin	Infantile form: impaired speech and motor development, hypotonia, spastic quadriplegia, ataxia Juvenile form: poor school performance, behavioral disturbances, loss of independent gait and speech Adult form: gradual impairment of intellectual function, behavioral/psychiatric disturbances
(Pro)supisin deficiency	Prosupisin or individual supisin	PSAP	Elevation of multiple SAs including GalCer, GlcCer, LacCer, GM1, GM2 and GM3	Generalized deficiency: severe acute neuronal ceroidosis disease including seizures, hypotonia, hepatosplenomegaly See also Krabbe disease (Sap A domain), Metachromatic leukodystrophy (Sap B domain) or Gaucher disease (Sap C domain) for isolated supisin defects
GM1-gangliosidosis	GM1 β-galactosidase	GLB1	Increased GM1 and GM2	Infantile form: developmental arrest and regression, seizures, cherry-red macular spot, myasthenia, hepatosplenomegaly Juvenile form: delayed motor and cognitive development Adult form: generalized dystonia
Tay-Sachs (or GM2-gangliosidosis, II variant)	β-hexosaminidase, α subunit	HEXA	Increased GM2	Infantile form: developmental arrest, cherry-red macular spot, startle response to noise, hypotonia, seizures, blindness, spasticity Juvenile form: dyspraxia, loss of speech, spastic paraparesis, ataxia, mental deterioration, psychosis Adult form: clumsiness, muscle weakness and atrophy, ataxia, psychosis, cognitive decline
GM2-gangliosidosis, A0 variant Sandhoff (or GM2-gangliosidosis, I variant)	GM2 activator β-hexosaminidase, β subunit	GM2A HEXB	Increased GM2 Increased GM2 and GM1	See Tay-Sachs disease See Tay-Sachs disease. In addition, hepatomegaly and skeletal abnormalities
Specific paraplegia 26	GM2/CO2 synthase	BAZ1B/PT1	In patient's skin fibroblasts: increased GM2 and reduced GM1	Onset from 2 to 18 years: progressive weakness, spasticity and cognitive impairment; cerebellar ataxia
Amish infantile epilepsy or 'old-and-pepper' syndrome	GM2 synthase	ITGAL3	In plasma and skin patient's fibroblasts: lack of GM2 (and GM3), increased GM1 and GM4 In plasma, increased LacCer	Severe irritability, poor feeding, vomiting, and failure to thrive; later, generalised seizures, developmental stagnation, hepatomegaly, choreoathetoid movements, deterioration of visual function, Sialin dysparaneuron
Gaucher types 2 and 3	Acid β-glucosyl-ceramidase	GBA	Increased GlcCer and glucosylsphingosine in cerebrum and cerebellum	Type 2 (infantile form): early-onset and rapidly progressing neurological deterioration with organomegaly Type 3 (juvenile/adult form): progressive neuropathology with myoclonus, ataxia, dementia and horizontal gaze palsy
Specific paraplegia 46	Non-pyrenoid β-glucosyl-ceramidase	GBC2	NA	Childhood onset, ataxia, spasticity, mild mental impairment, hearing loss, axonal neuropathy, male infertility

Abbreviations: LacCer, lactosylceramide; NA, not available; SP, sphingophosphocholine.

^a When no data regarding human brain are available, the nature of the biological material is indicated.

heterozygous deletion of *CERS2*, which results, at least in skin fibroblasts, in a partial reduction of very long chain (C24 and C26) ceramides (and SM) but a moderate increase in long chain ceramides. Whereas this may lead to altered membrane microdomains (and possibly perturbed sensitivity to neurotransmitters), the reason why *CERS2* haploinsufficiency leads to a neurological disorder is still unclear. In mice, the homozygous ablation of *Cers2*, which exhibits a rather ubiquitous expression, causes a severe disease involving both the brain and visceral organs [25–28]. The demyelination, astrogliosis, microglial activation, and myoclonic jerks seen in these mutant mice are likely related to the decreased brain levels of C22–C24-ceramides and, especially, non-hydroxy and 2-hydroxy-GalCer. These findings emphasize the importance of *Cers2*-derived SL species in myelin maintenance [see also *FA2H* defects].

Of interest is the finding that mutations in the *CLN8* gene, which are responsible for a form of neuronal ceroid lipofuscinosis, a neurodegenerative disorder characterized by progressive epilepsy and mental regression, are also associated with reduced Cer and GalCer levels in the brain of patients and mutant mice [29,30]. The *CLN8* gene encodes for an ER protein that shares domain homology with Cer synthases [31], and which may modulate their enzymatic activity.

To sum up, defective biosynthesis of some (dihydro)Cer species affects myelin and eventually causes seizures. Nevertheless, which SL alteration primarily accounts for the observed neurological phenotypes remains to be elucidated.

3.2. Defects in ceramidase action

Among the five human genes encoding ceramidases (see [32]), only that encoding acid, lysosomal ceramidase, *ASAH1*, is known to underlie human disease when mutated. At the homozygous or compound heterozygous level, pathogenic *ASAH1* mutations lead to different symptoms, most often described under the name of Farber disease or lipogranulomatosis [33]. The clinical spectrum of this disorder is quite broad, including subcutaneous nodules, joint stiffness and swelling (mimicking juvenile arthritis) and various neurological manifestations, in particular seizures and progressive deterioration. A variant, CNS-restricted form of the disease has recently been recognized, which manifests as a spinal muscular atrophy with progressive myoclonic epilepsy [34,35]. Because of the loss (or marked decrease) of acid ceramidase activity, the undegraded Cer accumulates within cells: tissues and body fluids (except, possibly, in case of progressive myoclonic seizures where Cer accumulation might occur only in neurons). In patients' brain, storage of both non-hydroxy and 2-hydroxy-ceramides has been documented, suggesting that part of the accumulated Cer originates from the myelin galactolipids [33]. Further investigation of a new mouse model for Farber disease should tell us whether the pathological changes that accompany lysosomal Cer storage are uniquely mediated by an abnormal cytokine response [36].

A second gene defect can account for perturbed lysosomal Cer turnover. Some mutations in the prosaposin *PSAP* gene lead to a fatal neonatal disease that features massive neuronal loss and lysosomal storage of multiple SLs, including Cer [37–40]. The accumulation of Cer in this disease is likely due to the loss of function of the saposin D domain that normally serves as an activator of acid ceramidase [41, 42]. Accordingly, specific deficiency of saposin D in mice results in Cer storage and cerebellar Purkinje cell degeneration [43].

Thus, both insufficient and excessive Cer cause brain dysfunction with a quite comparable symptomatology in humans.

4. Defects of sphingomyelin metabolism

In agreement with studies in mice indicating that defects in either SM synthase 1 or 2 do not induce gross abnormalities, no human disease of SM biosynthesis has yet been reported. Only a recessive disorder due to mutations in the *SMPD1* gene encoding acid sphingomyelinase is

known. The neuronopathic form of this lysosomal disorder is called Niemann–Pick disease type A. This severe form of acid sphingomyelinase deficiency is characterized by a hepatosplenomegaly, and an early and rapid neurologic deterioration leading to death generally before 3 years of age [44]. A progressive hypotonia can be first noticed, followed by psychomotor regression. Three *SMPD1* mutations are particularly frequent in the Ashkenazi Jewish population (p.R498L, p.L304P, and p.F333S/GX52).

Mainly SM, but also cholesterol and sphingosylphosphocholine (i.e., lyso-SM) accumulate in visceral tissues, lymph nodes and the brain of Niemann–Pick type A patients [45,46]. Storage of bis(monoacylglycerol)phosphate is also evident in the liver. The two acid sphingomyelinase-deficient mouse models [47,48] display a neurodegenerative phenotype more or less similar to the human disease. The brain and cerebellum are particularly affected; they are atrophic, showing multilamellar cytoplasmic inclusions at the ultrastructural level. Loss of Purkinje cells is obvious. SM accumulation is seen in total brain extracts (along with GM2 and GM3) and in myelin [49,50]. Sphingosine and sphingosylphosphocholine levels are also increased in total brain extracts of deficient mice [51]. At the cellular level, the SL content of neuronal and glial cell membranes is modified. Lysosomal but also non-lysosomal membranes, including synaptic membranes, are enriched in SM and sphingosine [49–51]. This change of lipid membrane composition is thought to alter cell signaling (by affecting plasma membranes microdomains), neuronal polarization, calcium homeostasis, synaptic plasticity, myelin production and immune response (for a review, see [52]). Recently, SM accumulation in *Smpd1*^{−/−} neurons was shown to be involved in the reduced number and size of dendritic spines [53] and to be associated with autophagy dysfunction [54]. All these findings provide new insights for the development of novel therapeutic strategies in addition to enzyme replacement or gene therapy.

5. Defects of galactosphingolipid metabolism

Galactosylceramide-containing SLs, e.g. GalCer and its 3-O-sulfated derivative, are primarily myelin constituents [2]. Of note, these lipids characteristically contain 2-hydroxylated fatty acids. Not surprising, therefore, is the finding that mutations in the *FA2H* gene impair the formation of these myelin SLs both in humans and mice [55–59].

The hydroxylase encoded by *FA2H*, a gene highly expressed in oligodendrocytes, produces 2-hydroxylated fatty acyl-CoAs, which are then incorporated by Cer synthases into SLs, especially galactolipids [60]. Homozygous *FA2H* mutations result in different clinical phenotypes. Some patients present a progressive extrapyramidal syndrome and excessive iron deposition in the brain, some others with spastic paraplegia (SPG35) complicated by cognitive decline, seizures and radiological features of leukodystrophy. To our knowledge, no brain sample from any of these patients has been analyzed. However, in the *Fa2h*-deficient homozygous mice the brain was almost devoid of 2-hydroxy-galactolipids, but enriched in non-hydroxy GalCer [56,59]. In these models, myelin remains normal in young animals while demyelination is seen in aged mice. As the human disease does not manifest before the age of 3, this has led to the conclusion that 2-hydroxy-galactolipids are essential for long-term maintenance rather than formation of myelin. 2-Hydroxylation of SLs may help stabilize lateral interactions between SLs and membrane–membrane interactions [56,60].

The impairment of the lysosomal catabolism of galactosphingolipids leads to two severe neurological lysosomal storage diseases characterized by progressive demyelination. Metachromatic leukodystrophy is generally due to mutations in the *ARSA* gene that encodes arylsulfatase A, the enzyme that removes the sulfate group from GalCer [61–63]. GalCer is then hydrolyzed to Cer through the action of β -galactosylceramidase, and mutations in the *GALC* gene that impair this reaction lead to Krabbe disease [64].

Several clinical forms of metachromatic leukodystrophy are classically described, according to the age of onset and severity of the disease. The late infantile form is the most severe form, with symptoms occurring between a few months to 2 years of age. Psychomotor delay is first noticed [65], followed by an inexorable psychomotor regression leading to gait and speech loss and then to death. Hypotonia, ataxia, paresis, blindness and pyramidal syndrome are classically reported. Other forms are characterized by a later onset, attenuated symptoms and a slower course. Of note, a similar disease with late onset can be occasionally due to saposin B deficiency (mutations in the *PSAP* gene), as this saposin activates arylsulfatase A [66–68]. Sulfatides accumulate in some visceral tissues but also in neurons, astrocytes and primarily in oligodendrocytes of the CNS and peripheral nervous system [63,69]. Accumulation of lysosulfatide (i.e., galactosylsphingosine-3-O-sulfate) has also been reported [70,71]. Both the storage of (lyso)sulfatides and the lack of GalCer may account for the alterations in myelin structure and properties. As compared to human patients, *Ana* knockout mice display a milder phenotype, limited to impaired neuromotor coordination and deafness [72]. Demyelination is absent and the ultrastructure of the myelin sheath is preserved, in agreement with the lesser SL storage observed in these mice. Transgenic *Ana* knockout mice overexpressing the enzymes of galactosphingolipid biosynthesis were engineered in order to increase sulfatide storage [73,74]. These animal models demonstrated that the accumulation of sulfatides not only in myelin-forming cells, but also in neurons, contributes to the severe neurological symptomatology that can be observed in the human disease. Nevertheless, the molecular mechanisms that lead to demyelination remain unclear [75].

The next step of galactosphingolipid catabolism is catalyzed by the β -galactosylceramidase. This enzyme was canonically known to convert GalCer into Cer in the lysosome, but was shown to be also responsible for the hydrolysis of its “lyso-derivative” galactosylsphingosine (also termed psychosine) and of other galactolipids [76]. Mutations in the *GALC* gene leads to Krabbe disease, also called globoid cell leukodystrophy. The onset of the infantile form often occurs before one year of age, the presenting signs including stiffness, irritability and developmental delay. Then, hypertonic episodes such as opisthotonos and myoclonic seizures appear. A rapid regression follows, leading to blindness, deafness, hypotonia and, finally, a vegetative state. Death occurs around 2 years of age. Late infantile, juvenile and adult forms are less severe and show highly variable and unpredictable clinical presentations and evolution. MRI can reveal demyelination, gliosis, late-stage cerebral atrophy, or cerebral calcifications. The twitcher mouse represents an authentic model of Krabbe disease [77]. In humans and mice, cellular alterations include macrophage (globoid cells) infiltration of the brain parenchyma, loss and dysfunction of oligodendrocytes and axonal damage [78,79]. Unexpectedly, while GalCer does not accumulate in the brain neither of Krabbe patients nor twitcher mice, galactosylsphingosine clearly does, especially in the white matter [80,81]. There is now convincing evidence for psychosine toxicity, but the underlying mechanisms are ill-defined. Psychosine can induce oligodendrocyte [82–84] as well as neuronal apoptosis, and axonopathy [79]. It was also shown to act on the actin structure of endothelial cells, inhibiting angiogenesis in the brain [85]. As already postulated for other (lyso)SLs, the accumulating psychosine could affect the membrane microdomain architecture, and inhibit PKC and the associated signaling pathways [86,87]. Psychosine can also elicit oxidative stress [88,89]. Recently, it was shown to accelerate the fibrillization of α -synuclein in neurons [90].

Saposin A is the physiological activator of β -galactosylceramidase. Accordingly, mutations in the *PSAP* domain encoding saposin A result in symptoms that are similar to Krabbe disease [91]. The phenotype of saposin A-deficient mice is quite similar to, but in terms of symptomatology and SL storage, milder than that of the twitcher mouse [92]. However, a doubly deficient mouse, obtained by breeding twitcher and saposin A-deficient mice, presented with more severe neurological symptoms than twitcher mice, and widespread neuronal cell

death mainly affecting the hippocampus, but also the cerebral cortex. The brain of these mice showed much greater accumulation of lactosylceramide than the twitcher mice, suggesting that lactosylceramide could contribute to the hippocampal neuronal formation and maintenance [93].

6. Defects of ganglioside and glucosylceramide metabolism

Inherited deficiencies of the enzymes that both synthesize and degrade glycosphingolipids are known. Here, only those that primarily affect the CNS will be considered.

6.1. Defects in ganglioside biosynthesis

Deficient synthesis of GM3 or GM2/GD2 is now known to result in human neurological disease. Loss-of-function mutations in the *ST3GAL5* gene, encoding for the sialyltransferase that synthesizes the simplest ganglioside GM3 (see Fig. 1), cause a recessive infantile-onset symptomatic epilepsy associated with developmental stagnation [94]. In some patients brain MRI has shown occipital white matter abnormalities and cortical atrophy [95]. Abnormally pigmented skin is also observed in some patients [96]. Other mutations, that make the GM3 synthase unstable, appear to lead to a different clinical picture: the so-called ‘salt-and-pepper’ syndrome includes facial dysmorphism, severe intellectual disability, seizures, spasticity, choreoathetosis and hyper- and hypo-pigmented skin areas [97]. While no data regarding the brain SL composition in this condition are available, the expected lack of GM3 was found in the patients’ plasma or skin fibroblasts [94,97]. This was accompanied by a reciprocal increase in the levels of lactosylceramide and glycolipids of the globo- and neolacto-series. Gene targeting of GM3 synthase in mice also impairs neuropsychological behavior [98,99] or causes hearing loss [100]. Whether the increased apoptosis observed in patient’s fibroblasts [95] or neural crest cells of zebrafish embryos after *ST3gal5* knockdown [97] reflects what may happen in the CNS is unknown. In addition, whether this cell death is triggered by the lack of GM3 (or more complex downstream gangliosides) or the accumulation of globosides needs to be elucidated.

B4GALNT1 mutations also cause in humans an autosomal recessive disorder characterized by a spastic paraplegia, SPG26 [101,102]. The main feature is a progressive weakness and spasticity affecting the lower and, in some cases, the upper extremities. Patients may also present with a moderate cognitive impairment, cerebellar signs, sensory neuropathy, and psychiatric symptoms. Brain MRI may reveal cortical or subcortical atrophy. Because the *B4GALNT1* gene codes for β -1,4-N-acetyl-galactosaminyltransferase 1, i.e., GM2/GD2 synthase (see Fig. 1), a reduction in brain levels of these gangliosides is anticipated in case of pathogenic mutations. Indeed, glycolipid analysis of patients’ fibroblasts showed a lack of GM2 and an accumulation of GM3 gangliosides [103]. Which of these changes (or additional modifications of the major brain gangliosides) leads to the disease manifestations clearly requires further investigation. To address this question, not only biochemical data on patients but also novel animal models are needed. As a matter of fact, the current murine models that lack GM2/GD2 synthase activity do not exhibit major behavioral abnormalities [104–106], emphasizing possible differences between humans and mice in ganglioside metabolism (see also GM2 catabolism below).

6.2. Defects in ganglioside catabolism

6.2.1. Defective catabolism of GM1

GM1 (actually GM1a) is one of the major brain gangliosides in mammals. This ganglioside and its asialo-derivative, namely GA1, are normally degraded in the lysosomes by β -galactosidase, an enzyme also able to ensure the degradation of other glycoconjugates. Mutations in the *GLB1* gene lead to two distinct human diseases. While Morquio disease type B (mucopolysaccharidosis type IV B) is dominated by

bone abnormalities, GM1-gangliosidosis is primarily a neurological disorder. Its non-neurological manifestations likely result from the impaired catabolism of oligosaccharides and glycosaminoglycans. Three forms of GM1-gangliosidosis are described according to the age of onset [107]. The infantile form is characterized by a rapid neurological regression leading to death within a few years. The most usual symptoms include mental retardation and hypotonia but also visceromegaly, macular cherry-red spots, skeletal abnormalities and coarse facial features. The juvenile form is of intermediate severity. Psychomotor regression occurs between 7 months and 3 years of age. Visceral and skeletal involvements are less frequent than in the infantile form. Hypotonia, incontinence, seizures, muscle weakness, lethargy, and strabismus are common features. The adult form presents with skeletal abnormalities and neurological symptoms, including gait disturbances, speech difficulties, dystonia and, less frequently, seizures. While oligosaccharides accumulate in visceral organs, increased levels of GM1 and GA1 are observed in the gray matter of patients' brain [108,109]. Of note, the β -galactosidase-deficient mice present with the main neuropathological and neurochemical features of the human infantile disease [110]. Microscopic analyses revealed vacuolization of neurons and astrocytes, associated with neuronal cell death, demyelination, astrogliosis and microgliosis. How GM1 storage leads to such cellular damages remains poorly understood. Among other hypotheses, ER stress, mitochondria or autophagy-mediated apoptosis have been implicated [111–114]. An inflammatory response has also been incriminated [115]. The myelin deficit could be secondary to neuron, astrocyte and/or oligodendrocyte dysfunctions [116,117].

6.2.2. Defective catabolism of GM2

GM2 storage diseases, namely GM2-gangliosidosis, can arise from distinct molecular defects. Degradation of the GM2 ganglioside starts by its cleavage by the lysosomal enzyme β -hexosaminidase A, which catalyzes the removal of the β -N-acetylgalactosamine residue of the oligosaccharide moiety of the ganglioside. β -Hexosaminidase A is composed of two subunits, α and β , which are encoded by the *HEXA* and *HEXB* genes, respectively. Mutations carried by either of these genes induce GM2-gangliosidosis. In addition, the presence of a third peptide, namely the GM2 activator protein, is absolutely needed for β -hexosaminidase A to ensure GM2 cleavage. Consequently, defects in the *GM2AP* gene also lead to GM2-gangliosidosis.

Mutations in the *HEXA* gene refer to Tay-Sachs disease. This disease is particularly frequent in the Ashkenazy Jewish and Quebec populations [118]. The infantile form begins with mild motor weakness around 3 to 5 months of age, and startled responses to noise. Then, hypotonia, decreased attentiveness, staring episodes and unusual eye movements can be noticed. The presence of a macula cherry red-spot is extremely frequent. Regression occurs from 10 months of age, with a rapid neurologic deterioration, progressive visual loss, and seizures. Macrocephaly resulting from cerebral gliosis can be seen around 2 years of age. The disease eventually leads to a vegetative state, and death occurs between 3 and 5 years of age [119]. In the juvenile form, gait and speech disturbances are the most common symptoms at the onset of the disease. Incoordination, behavioral troubles, intellectual impairment, muscle weakness, seizures and extrapyramidal signs are also commonly observed. Disease often leads to death around the age of 15 [120]. The adult form is linked to a residual enzymatic activity and the diagnosis is often delayed. Patients can present with spinocerebellar ataxia or spinal amyotrophy. Psychotic episodes are also reported [121]. In all forms, brain imaging often reveals cerebral and cerebellar atrophy. Neurons of the whole nervous system are swollen with storage material, consisting in concentric lamellar structures upon ultrastructural examination [122]. Storage also affects the astrocytes. Neuronal loss and gliosis are observed. Ectopic dendritogenesis is another accompanying pathological feature [123]. GM2 accumulates in the brain of Tay-Sachs patients, primarily in the gray matter. Other gangliosides (GM1, GD1a, GD1b, GT1b) are decreased [124–126].

Mutations in the *HEXB* encoding for the β subunit not only affect β -hexosaminidase A ($\alpha\beta$ heterodimer) but also β -hexosaminidase B ($\beta\beta$ homodimer that takes part in neutral SLs and oligosaccharides catabolism). This defect leads to Sandhoff disease [127], that is clinically quite indistinguishable from Tay-Sachs disease except that it also features systemic manifestations such as hepatosplenomegaly [128] and some involvement of bones and even the heart [129]. GM2 and GA2 accumulate in the brain, and globosides in visceral organs [127].

Hexb-deficient mice display an unexpected phenotype, with no neurological symptoms. This is because, unlike its human counterpart, the murine sialidase could actually ensure some conversion of GM2 into GA2 (which would be then degraded to lactosylceramide by β -hexosaminidase B) [130]. The *Hexb* knockout mouse appears as a better model of human GM2-gangliosidosis as it exhibits a phenotype quite similar to the human disease. Studies performed using this model tend to incriminate neuroinflammation (microglial and astrocyte activation) in neurodegeneration [131,132]. However, in a recent study, correction of the GM2 storage specifically in neurons of *Hexb* knockout mice was sufficient to avoid neurodegeneration and to restore a normal motor behavior, despite the persistence of microglial and macrophage activation [133]. This work supports the idea that neuroinflammation only partially contributes to neuronal cell death.

6.3. Defects of glucosylceramide metabolism

While a unique enzyme catalyzes the synthesis of GlcCer from Cer, at least two (possibly three) enzymes cleave GlcCer by removing the β -glucose, which represents the very last degradation step of numerous glycosphingolipids. No genetic defect of GlcCer synthase is known in humans but two neurological diseases are due to mutations in the genes encoding β -glucosylceramidases.

Pathogenic mutations of the *GBA* gene cause Gaucher disease, the most prevalent lysosomal storage disease. This autosomal recessive condition is due to the deficient activity of acid β -glucocerebrosidase (or acid β -glucosidase), a lipid hydrolase encoded by the *GBA1* gene, mapped to 1q21–22 [134]. Over 300 pathogenic mutations have been identified resulting in the accumulation of GlcCer. Gaucher disease is characterized by storage of GlcCer in cells of the reticulo-endothelial system in the liver, spleen and bone marrow. There are three distinct phenotypes, the most common being type 1, which is a chronic, non-neuropathic disease with onset in childhood or adulthood [135]. Types 2 and 3 are neuropathic forms with CNS involvement. The distinction between these two types was previously based on the age of onset of neurologic signs and the rate of disease progression but neuropathic Gaucher disease forms seem to represent a phenotypic continuum. In classic type 2 Gaucher disease, onset of symptoms occurs before 2 years of age, manifesting with a rapidly progressive course, limited psychomotor development, and death within the first two years [136,137]. The most frequent initial signs are hyperextension of the neck, swallowing difficulties, and strabismus. Then, provoked apnoeic episodes generally appear, followed by prolonged spontaneous apnoea. Generalized seizures, myoclonic epilepsy and progressive microcephaly may be observed. Lung disease is the predominant visceral involvement but hepatosplenomegaly, failure to thrive, thrombocytopenia, and anaemia are present. Type 3 Gaucher disease comprises a heterogeneous group of patients with mild to severe visceral involvement combined with variable, slowly progressive neurological involvement. Some subtypes have been distinguished based on the occurrence of progressive myoclonic epilepsy or oculomotor apraxia associated with more or less severe systemic involvement [138]. Oculomotor anomalies (horizontal supranuclear gaze palsy) are usually the first neurological sign. Generalized tonic-clonic seizures and cerebellar ataxia, extrapyramidal signs, cognitive regression, or psychiatric disturbance can be observed. Whereas Gaucher patients with at least one p.N370S *GBA* allele do not develop primary neurologic disease, those who carry the

pL444P substitution tend to have a severe, often neurological form (type 2 or 3) [135,137,139].

A rare variant of Gaucher disease is caused by mutations in the prosaposin (*PSAP*) gene which affects saposin C. This saposin likely favors accessibility of the GlcCer substrate to β -glucocerebrosidase [140]. Mutated saposin C can lead to visceral, non-neuronopathic or type 3-like Gaucher disease.

The neuropathology of neuronopathic Gaucher disease, which is dominated by neuronal cell loss, is not fully understood. GlcCer accumulates in the brain, cerebellum, and cerebrospinal fluid of types 2 and 3 patients [141]. A relative reduction in gangliosides has been observed in all tissues, but GD3 levels were relatively increased in the nervous tissue. While GlcCer storage may underlie the macrophage activation and dysfunction in peripheral tissues, GlcCer excess does not appear critical for the CNS pathology. However, the unacylated derivative of GlcCer may play a key role. Glucosylsphingosine levels were found increased in cerebrum and cerebellum in types 2 and 3 patients [141, 142], as well as in mouse models of neuronopathic Gaucher. This lysolipid may be the culprit as it proved to be toxic on cultured neuronal cells (see Table 1). It has recently been proposed that the receptor-interacting protein kinase-3 (*Ripk3*) may be critically involved in the non-apoptotic (necroptotic) neuronal cell death and neuroinflammation in Gaucher, and possibly also Krabbe, disease [143]. Whether the accumulated glucosylsphingosine orchestrates this pathway remains to be determined. In addition, of interest is the fact that *GBA1* mutations represent the most important risk factor for developing α -synucleinopathies such as Parkinson disease [144]. It is still a matter of debate whether alterations in GlcCer (or Cer) metabolism primarily contribute or initiate the accumulation and aggregation of α -synuclein and other proteins including the amyloid precursor protein [145].

Mutations of the *GBA2* gene, encoding a non-lysosomal β -glucosylceramidase, have been reported very recently to be associated with an autosomal recessive form of progressive cerebellar ataxia [146]. Spasticity initially affects the lower limbs, and is later followed by dysarthria and dysphagia. In some patients, the clinical picture was that of a hereditary spastic paraplegia (SPG46). This phenotype contrasts with the absence of neurological disturbances in mice with disrupted *Gba2* [147]. However, an impairment in the outgrowth of spinal neuron axons has been observed in the zebrafish after inactivation of *Gba2* by antisense morpholino oligonucleotides [148]. So far, because no biochemical (e.g., sphingolipidomic) data are available regarding patients with *GBA2* mutations, the pathogenic mechanisms that underlie this disease are unknown. Whether the pathology is related to GlcCer accumulation or lack of production of some Cer species, either directly because of deficient activity of *GBA2* or indirectly through effects on other glucosylceramidases remains to be determined.

7. Concluding remarks

Since their discovery by Thudichum, brain SLs have been the subject of intense investigation. Insights into their physiological functions have largely benefited from the study of several lysosomal storage disorders that affect the nervous system [149,150]. Further genetic disorders characterized by defective biosynthesis of SLs have been described very recently. Together, these human genetic conditions and their counterparts in murine models [151,152] provide invaluable clues to unravel the roles of SLs in brain physiology and pathology. Nevertheless, because of the structural diversity of SLs and the complexity of their metabolism, the precise nature of the SL that really causes brain dysfunction in many of these disorders is still unclear. The SL, either substrate or product of a deficient enzyme, that exhibits the most prominent quantitative change is often viewed as the culprit. However, the possibility that minor variations in an upstream, downstream or by-product SL (i.e., either excessive or deficient levels) also participate to the pathophysiology of disease cannot currently be ruled out. The identification of such subtle or even secondary changes as well as the

elucidation of the mechanisms that underlie the molecular pathogenesis (see [153]) is of utmost importance as it could open new avenues of therapeutic intervention (see [154]) not only for this class of genetic disorders but also possibly for other neurological diseases.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found in the online version.

Acknowledgments

Studies by T. Levade's group were supported by INSERM, Université Paul Sabatier, ANR (SphingoDR program), RITC, LNCC (Equipe labellisée 2013), CHU Toulouse, and Vaincre les Maladies Lysosomales Foundation.

References

- [1] E. Faly, D. Cotter, M. Sui, S. Subramaniam, Lipid classification, structures and tools. *Biochim. Biophys. Acta* 1813 (11) (2011) 637–647.
- [2] P.S. Saty, Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog. Lipid Res.* 24 (2) (1985) 69–176.
- [3] T. Ariga, W.D. Jarvis, K.K. Ye, Role of sphingolipid-mediated cell death in neurodegenerative diseases. *J. Lipid Res.* 39 (1) (1998) 1–16.
- [4] R. Bucciero, A.H. Futerman, The roles of ceramide and complex sphingolipids in neuronal cell function. *Pharmacol. Res.* 47 (5) (2003) 409–419.
- [5] I. Colombant, M. Garcia-Gil, Sphingolipid metabolites in neural signalling and function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 46 (3) (2004) 328–355.
- [6] E.L. Poise de Chaves, Sphingolipids in apoptosis: survival and regeneration in the nervous system. *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (12) (2006) 1905–2015.
- [7] T. Okada, T. Kajimoto, S. Jahangeer, S. Nakamura, Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate signaling in central nervous system. *Cell Signal.* 23 (1) (2009) 7–13.
- [8] N.J. Haughey, V.V. Bandaru, M. Rao, M.P. Madison, Roles for dysfunctional sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease neuropathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1801 (8) (2010) 878–896.
- [9] C.R. Nevins, V.A. Hannun, The roles of neutral sphingomyelinases in neurological pathologies. *Neurochem. Res.* 37 (6) (2012) 1137–1149.
- [10] L. Davies, R. Fassbender, S. Walker, Sphingolipids in neuroinflammation. *Handb. Exp. Pharmacol.* 210 (2013) 421–430.
- [11] H.J. Maccioni, J.L. Guerin, J.A. Martina, Organization of ganglioside synthesis in the Golgi apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* 1437 (2) (1998) 101–108.
- [12] T. Köster, K.L. Proia, R. Sandhoff, Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 277 (29) (2002) 25898–25902.
- [13] G. van Edt, T. Decker, T. Heyger, Sphingolipid metabolism in neural cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (12) (2006) 1978–1994.
- [14] K.L. Schaar, R. Genanty-Schah, H. Tikkebrandt, Sialic acid in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiol. Rev.* 94 (2) (2014) 461–518.
- [15] G. Trifunovic, R. Bassi, P. Vanni, L. Raboni, Salvage pathways in glycosphingolipid metabolism. *Biochimie* 85 (3–4) (2003) 423–437.
- [16] T. Köster, K. Sandhoff, Lysosomal degradation of membrane lipids. *FEBS Lett.* 504 (6) (2001) 1700–1712.
- [17] Y. Pewzner-Jang, S. Ben-Dor, A.H. Futerman, When do Luses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)? insights into the regulation of ceramide synthesis. *J. Biol. Chem.* 281 (35) (2006) 25000–25005.
- [18] A. Trubel, T. Maas, P.E. Calle, N. Malik, The longevity assurance homologue of yeast *Iqg1* (*Iass*) gene family (review). *Int. J. Mol. Med.* 23 (3) (2009) 133–140.
- [19] M. Levy, A.H. Futerman, Mammalian ceramide synthases. *Biochim. Biophys. Acta* 1801 (5) (2010) 347–356.
- [20] T.D. Mallen, V.A. Hannun, L.M. Obeid, Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochem. J.* 441 (3) (2012) 789–802.
- [21] N. Vanni, F. Fracalossi, E. Fedraro, P. Striani, A. Robustiano, M. Tuvesco, T. Sanzini, A. Falace, E. Gatzert, P. Rasmanni, et al., Impairment of ceramide synthesis causes a novel progressive myoclonus epilepsy. *Ann. Neurol.* 76 (2) (2014) 206–212.
- [22] L. Zhao, S.D. Spasheva, T.J. Jactus, L.D. Shultz, H.E. Shick, W.B. Macdise, V.A. Hannun, L.M. Obeid, S.L. Adelman, A deficiency of ceramide biosynthesis causes cerebellar Purkinje cell neurodegeneration and lipofuscin accumulation. *PLoS Genet.* 7 (5) (2011) e1002063.
- [23] C. Ginkel, D. Hartmann, K. vom Dorp, A. Zlomisica, H. Farwanah, M. Eckhardt, R. Degert, M. Rabinov, E. Dene, et al., Ablation of neuronal ceramide synthase 1 in mice decreases ganglioside levels and exacerbates of myelin-associated glycoprotein in oligodendrocytes. *J. Biol. Chem.* 287 (30) (2012) 41868–41902.
- [24] M.A. Mosbeck, A.S. Obeid, D. Neiss, O. Ben-David, L.L. Kötter, J. Jansen, A. Sabers, J. Vissing, J.E. Nielsen, L. Hahnel, et al., Reduced ceramide synthase 2 activity causes progressive myoclonic epilepsy. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 1 (2) (2014) 88–98.
- [25] Y. Pewzner-Jang, O. Brenner, S. Braun, E.L. Laviad, S. Ben-Dor, E. Feldmesser, S. Viver-Saban, D. Amann-Zakariets, C. Raanan, T. Berkutzi, et al., A critical role for ceramide synthase 3 in liver homeostasis II: insights into molecular changes leading to hepatopathy. *J. Biol. Chem.* 285 (14) (2010) 10811–10823.
- [26] Y. Pewzner-Jang, H. Park, E.L. Laviad, L.C. Silva, S. Lahiri, J. Shihao, E. Eren-Roman, B. Bruggen, T. Sachthofer, F. Wieland, et al., A critical role for ceramide synthase 2

- in liver homeostasis: 1. Alterations in lipid metabolic pathways, *J. Biol. Chem.* 285 (14) (2010) 10962–10970.
- [27] S. Ingstrand, D. Härtzen, F. Farwanah, M. Eckhardt, R. Sandhoff, J. Degen, V. Gieselmann, K. Sandhoff, K. Willecke, Adult ceramide synthase 2 (CERT2) deficient mice exhibit myelin sheath defects, cerebellar degeneration, and hepatocarcinomas, *J. Biol. Chem.* 284 (40) (2009) 33549–33560.
- [28] O. Ben-David, Y. Pevzner, Jang, O. Brenner, E.L. Laviad, A. Egozi, I. Levin, I. Weissberg, I.E. Bizzi, K. Pienik, E. Wang, S. Kelly, et al., Encephalopathy caused by ablation of very long acyl chain ceramide synthesis may be largely due to reduced galactosylceramide levels, *J. Biol. Chem.* 286 (34) (2011) 30033–30033.
- [29] M. Hermanson, E. Kabela, M. Berghall, A.E. Lehesjoki, P. Somerharju, U. Lahtinen, Mass spectrometric analysis reveals changes in phospholipid, neutral sphingolipid and sulfatide molecular species in progressive epilepsy with mental retardation, *EPMR: brain: a case study, J. Neurochem.* 95 (3) (2005) 609–617.
- [30] M. Kuronen, M. Heimonen, O. Manninen, L. Zech, M. Tahvilä, T. Laitinen, O. Grohn, P. Somerharju, M. Eckhardt, J.D. Cooper, et al., Galactosylid deficiency in the early pathogenesis of neuronal ceroid lipofuscinosis model: Genet. implications in delayed myelination and oligodendrocyte maturation, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 38 (5) (2012) 471–486.
- [31] E. Winter, C.P. Ponting, TRAM, IAG1 and CLN8: members of a novel family of lipid-sensing domains? *Trends Biochem. Sci.* 27 (8) (2002) 381–383.
- [32] C. Mao, L.M. Ojeid, Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate, *Biochim. Biophys. Acta* 1781 (9) (2008) 434–434.
- [33] T. Levaade, K. Sandhoff, H. Schulze, J.A. Medin, Acid ceramidase deficiency: Farber lipogranulomatosis, in: D. Valle (Ed.), *Scriver's OMMBID (Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease)*, McGraw-Hill, New York, 2009 (<http://www.ombid.com>).
- [34] J. Zhou, M. Tavakoli, F.D. Tezcan, J. Vellies, M. Bayes, F. Nolent, V. Garcia, S. Servadei, E. Bertini, F. Castro-Gomez, et al., Spinal muscular atrophy associated with progressive myoclonic epilepsy is caused by mutations in *ASAH1*, *Am. J. Hum. Genet.* 91 (1) (2012) 5–14.
- [35] D. Dymov, K. Sell, M. Vanstone, A. Smith, G. Garandea, V. Garcia, S. Carpenter, E. Le Trouzart, F. Sabourdy, C. Beaulieu, et al., Evidence for clinical, genetic and biochemical variability in spinal muscular atrophy with progressive myoclonic epilepsy, *Clin. Genet.* 86 (6) (2014) 558–563.
- [36] A.M. Alayubi, J.C. Wang, B.C. Au, S. Carpenter, V. Garcia, S. Dvorakova, S. El-Gharrafi, K.N. Kinnear, M.J. Enerow, Z.J. Xiong, et al., Systemic ceramide accumulation leads to severe and varied pathological consequences, *EMBO Mol Biol* 5 (6) (2013) 827–842.
- [37] D. Schrabel, M. Schroder, W. Furst, A. Klein, R. Hurwitz, T. Zeeck, J. Weber, K. Harzer, B.C. Paton, A. Poulos, et al., Simultaneous deficiency of sphingolipid activator proteins 1 and 2 is caused by a mutation in the initiation codon of their common gene, *J. Biol. Chem.* 287 (5) (2012) 3312–3315.
- [38] H. Hudkova, M. Gravenkova, J. Ledvinova, M. Tockachova, M. Hrebicki, H. Popperova, A. Belekada, L. Berta, B.C. Paton, K. Harzer, et al., A novel mutation in the coding region of the prosaposin gene leads to a complete deficiency of prosaposin and saposins, and is associated with a complex sphingolipidosis dominated by lactosylceramide accumulation, *Hum. Mol. Genet.* 10 (9) (2001) 927–940.
- [39] M. Ellender, M. Jerabkova, A. Belekada, M. Hrebicki, L. Berta, J. Ledvinova, H. Hudkova, H. Rosewich, N. Schynik, B.C. Paton, et al., Prosaposin deficiency – a rarely diagnosed, rapidly progressing, neonatal neurovisceral lipid storage disease. Report of a further patient, *Neuropediatrics* 36 (3) (2005) 171–180.
- [40] J. Kuchar, J. Ledvinova, M. Hrebicki, H. Myskova, L. Dvorakova, L. Berta, P. Chazcua, B. Adame, M. Ellender, M. Petrasovcova, et al., Prosaposin deficiency and saposin B deficiency (activator-deficient metachromatic leukodystrophy): report on two patients detected by analysis of urinary sphingolipids and carrying novel PSAP gene mutations, *Am. J. Med. Genet. A* 140A (4) (2009) 613–621.
- [41] N. Azama, J.S. O'Brien, H.W. Moses, Y. Kishimoto, Stimulation of acid ceramidase activity by saposin D, *Arch. Biochem. Biophys.* 311 (2) (1994) 354–357.
- [42] T. Linke, G. Wilkening, F. Sadelghar, H. Mozdall, K. Bernardo, E. Schuchman, K. Sandhoff, Interfacial regulation of acid ceramidase activity: Stimulation of ceramide degradation by lysosomal lipids and sphingolipid activator proteins, *J. Biol. Chem.* 276 (8) (2001) 5760–5768.
- [43] J. Matsumoto, M. Kikui, K. Tadano-Arimori, I. Ishizuka, K. Tomiyaga, K. Tsuda, T. Takeda, K. Suzuki, Y. Ruzsics, Mutation in saposin D (saposin D) of sphingolipid activator protein gene causes urinary system defects and cerebellar Purkinje cell degeneration with accumulation of hydroxy fatty acid-containing ceramide in mouse, *Hum. Mol. Genet.* 13 (21) (2004) 2700–2723.
- [44] M.M. McGovern, A. Amor, S.E. Brodie, R.J. Deneck, M.P. Wamersson, Natural history of Type A Niemann-Pick disease: possible endpoints for therapeutic trials, *Neurology* 66 (2) (2006) 226–232.
- [45] E.H. Schuchman, R.J. Deneck, Niemann-Pick disease Types A and B: acid sphingomyelinase deficiencies, in: D. Valle (Ed.), *Scriver's OMMBID (Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease)*, McGraw-Hill, New York, 2009 (<http://www.ombid.com>).
- [46] C. Rodriguez-Lafraie, M.T. Vanier, Sphingomyelinase deficiency in Niemann-Pick disease brain accumulation in type A but not in type B, *Neurochem. Res.* 24 (2) (1999) 199–205.
- [47] K. Hirotsuchi, S. Erlich, D.P. Perl, K. Frelan, C. Bugajer, R. Sandhoff, R.J. Deneck, C.L. Stewart, E.H. Schuchman, Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease, *Nat. Genet.* 10 (3) (1995) 288–293.
- [48] B. Otterbach, W. Stiefler, Acid sphingomyelinase-deficient mice mimic the neurovisceral form of human lysosomal storage disease (Niemann-Pick disease), *Cell* 81 (7) (1995) 1053–1061.
- [49] F. Scandroglio, J.K. Venkatas, N. Liberto, S. Prioni, E.H. Schuchman, V. Chigorno, A. Prinetti, S. Soenens, Lipid content of brain, brain membrane lipid domains, and neurons from acid sphingomyelinase deficient mice, *J. Neurochem.* 107 (2) (2008) 329–338.
- [50] C. Galvan, P.G. Camoleto, F. Cristofari, P.P. Van Veldhoven, M.D. Ledesma, Anomalous surface distribution of glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins in neurons lacking acid sphingomyelinase, *Mol. Biol. Cell* 19 (2) (2008) 509–522.
- [51] P.G. Camoleto, H. Vara, L. Moradillo, E. Connel, F.P. Marletto, M. Guastri, M. Saizue-Pognetto, P.P. Van Veldhoven, M.D. Ledesma, Synaptic vesicle docking: sphingosine regulates syntaxin1 interaction with Munc18, *PLoS One* 4 (4) (2009) e5330.
- [52] M.D. Ledesma, A. Prinetti, S. Soenens, E.H. Schuchman, Brain pathology in Niemann-Pick disease type A: insights from the acid sphingomyelinase knockout mice, *J. Neurochem.* 116 (5) (2011) 779–788.
- [53] A.I. Arroyo, P.G. Camoleto, L. Moradillo, M. Saizue-Pognetto, M. Guastri, P.P. Van Veldhoven, E.H. Schuchman, M.D. Ledesma, Pharmacological reversion of sphingomyelinase-induced dendritic spine anomalies in a Niemann-Pick disease type A mouse model, *EMBO Mol Biol* 6 (3) (2014) 398–413.
- [54] E. Gabande-Rodriguez, P. Boya, V. Labrador, C.G. Dorri, M.D. Ledesma, High sphingomyelin levels induce lysosomal damage and autophagy dysfunction in Niemann-Pick disease type A, *Cell Death Differ.* 21 (8) (2014) 864–875.
- [55] S. Edvardsson, H. Hama, A. Shaq, J.M. Grenier, J. Berger, D. Soltes, S.H. Korsman, I. Tauson, A. Saada, O. Elpeleg, Mutations in the fatty acid 2-hydroxylase gene are associated with leukodystrophy with spastic paraparesis and dystonia, *Am. J. Hum. Genet.* 83 (3) (2008) 643–648.
- [56] I. Zoller, M. Metzner, D. Hartmann, H. Buzsaki, R. Meyer, V. Gieselmann, M. Eckhardt, Absence of 2-hydroxylated sphingolipids is compatible with normal neural development but causes late-onset axon and myelin sheath degeneration, *J. Neurosci.* 28 (39) (2008) 9741–9754.
- [57] K.J. Dick, M. Eckhardt, C. Paisan-Ruiz, A.A. Abhebbi, C. Poulakis, N.A. Sibson, H. Maier, R. Sharif, M.A. Patton, W. Banke, et al., Mutation of *FA2H* underlies a complicated form of hereditary spastic paraplegia (SPG35), *Hum. Mutat.* 31 (4) (2010) E1231–E1260.
- [58] M.C. Kreier, C. Paisan-Ruiz, N. Boddaert, M.Y. Yoon, H. Hama, A. Gregory, A. Malandrini, E.L. Wuljter, A. Murnich, S. Gobin, et al., Defective *FA2H* leads to a novel form of neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA), *Ann. Neurol.* 68 (5) (2010) 611–618.
- [59] K.A. Potter, M.J. Kern, G. Fullbright, J. Bielawski, S.S. Scherer, S.W. Yarn, J.J. Li, H. Cheng, X. Han, J.K. Venkatas, et al., Central nervous system dysfunction in a mouse model of *FA2H* deficiency, *Glia* 59 (7) (2011) 1009–1021.
- [60] K. Hama, Fatty acid 2-hydroxylase in mammalian sphingolipid biology, *Biochim. Biophys. Acta* 1801 (4) (2010) 405–414.
- [61] J. Austin, D. McAfee, L. Shearer, Metachromatic form of diffuse cerebral sclerosis: low sulfatase activity in the urine of nine living patients with metachromatic leukodystrophy (MLD), *Arch. Neurol.* 12 (1965) 447–455.
- [62] E. Mehl, H. Jarzkwitz, Evidence for the genetic block in metachromatic leukodystrophy (ML), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19 (1965) 407–411.
- [63] V. Gieselmann, I. Krägeloh-Mann, Metachromatic leukodystrophy, in: D. Valle (Ed.), *Scriver's OMMBID (Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease)*, McGraw-Hill, New York, 2009 (<http://www.ombid.com>).
- [64] K. Suzuki, Globoid cell leukodystrophy (Krabbe's disease): deficiency of galactocerebroside beta-galactosidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 66 (3) (1970) 302–309.
- [65] B. Hagberg, Clinical aspects of globoid cell and metachromatic leukodystrophies, *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 7 (1) (1971) 103–112.
- [66] G. Fischer, H. Jarzkwitz, The activator of cerebroside sulphatase. Binding studies with enzyme and substrate demonstrating the detergent function of the activator protein, *Biochim. Biophys. Acta* 40 (2) (1977) 561–572.
- [67] K.A. Kretz, G.S. Carson, S. Morimoto, Y. Kishimoto, A.L. Bhargya, J.S. O'Brien, Characterization of a mutation in a family with saposin B deficiency: a glycosylation site defect, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (7) (1990) 2541–2544.
- [68] M.A. Raff, X.L. Zhang, G. DeGala, D.A. Wenger, Detection of a point mutation in sphingolipid activator protein-1 mRNA in patients with a variant form of metachromatic leukodystrophy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166 (2) (1990) 1017–1023.
- [69] V. Gieselmann, U. Matzner, B. Hess, R. Lullmann-Rauch, R. Coenen, D. Hartmann, R. D'Hooge, P. DeDeyn, G. Nagels, Metachromatic leukodystrophy: molecular genetics and an animal model, *J. Inher. Metab. Dis.* 21 (5) (1998) 564–574.
- [70] B. Rosengren, P. Freedman, J.E. Manann, L. Svennerholm, Lysosulfatide (galactosylsphingosine-3-O-sulfate) from metachromatic leukodystrophy and normal human brain, *J. Neurochem.* 52 (4) (1989) 1035–1041.
- [71] E. Tada, T. Kobayashi, I. Goto, T. Kusakawa, K. Ogimori, Accumulation of lysosulfatide (sulfolactosylsphingosine) in tissues of a boy with metachromatic leukodystrophy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159 (2) (1989) 605–611.
- [72] B. Hess, P. Salzig, D. Hartmann, R. Coenen, R. Lullmann-Rauch, H.J. Goebel, M. Bove, E. von Figura, R. D'Hooge, G. Nagels, et al., Phenotype of arylsulfatase A deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (25) (1996) 14821–14826.
- [73] M. Eckhardt, K.K. Hedayati, J. Pitsch, R. Lullmann-Rauch, H. Beck, S.N. Fewow, V. Gieselmann, Sulfatide storage in neurons causes hyperexcitability and axonal degeneration in a mouse model of metachromatic leukodystrophy, *J. Neurosci.* 27 (34) (2007) 9009–9021.
- [74] H. Kamakrishnan, K.K. Hedayati, R. Lullmann-Rauch, C. Wessig, S.N. Fewow, H. Maier, H.J. Goebel, V. Gieselmann, M. Eckhardt, Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy, *J. Neurosci.* 27 (35) (2007) 9482–9490.

- [75] V. Gieselmann, I. Kragelsch-Mann, Metachromatic leukodystrophy – an update, *Neuropediatrics* 41 (1) (2010) 1–6.
- [76] T. Miyatake, K. Suzuki, Galactosylsphingosine galactosyl hydrolase in rat brain: probable identity with galactosylceramide galactosyl hydrolase, *J. Neurochem.* 22 (2) (1974) 231–237.
- [77] T. Kohayashi, T. Yamazaki, J.M. Jacobs, F. Tetzlaff, R. Suzuki, The Twitcher mouse: an enzymatically authentic model of human globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease), *Brain Res.* 202 (2) (1980) 479–483.
- [78] D.A. Wenger, M.L. Escolar, P. Luzzi, M.A. Rafi, Krabbe disease (Globoid Cell Leukodystrophy), in: D. Valle (Ed.), *Scriver's OMIM* (Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease), McGraw-Hill, New York, 2009 (<http://www.omim.org>).
- [79] L.C. Caselverri, M.I. Givogri, H. Zhu, B. Smith, A. Lopez-Rosas, X. Qiu, R. van Breemen, E.R. Bongarzono, Axonopathy is a compounding factor in the pathogenesis of Krabbe disease, *Acta Neuropathol.* 122 (1) (2011) 35–48.
- [80] L. Svennerholm, M.T. Vanier, J.E. Manson, Krabbe disease: a galactosylsphingosine (psychosine) lipidosis, *J. Lipid Res.* 21 (1) (1980) 53–64.
- [81] H. Igata, K. Suzuki, Progressive accumulation of toxic metabolite in a genetic leukodystrophy, *Science* 224 (4650) (1984) 753–755.
- [82] E. Haq, S. Giri, I. Singh, A.K. Singh, Molecular mechanism of psychosine-induced cell death in human oligodendrocyte cell line, *J. Neurochem.* 86 (6) (2003) 1429–1440.
- [83] M. Zaka, D.A. Wenger, Psychosine-induced apoptosis in a mouse oligodendrocyte progenitor cell line is mediated by caspase activation, *Neurosci. Lett.* 358 (3) (2004) 205–209.
- [84] J.S. Won, J. Kim, M.K. Pantila, I. Singh, A.K. Singh, Role of endogenous psychosine accumulation in oligodendrocyte differentiation and survival: implication for Krabbe disease, *Brain Res.* 1508 (2013) 44–52.
- [85] M. Belleri, R. Rocca, D. Coltrini, B. Nico, D. Ribatti, P.L. Poliani, A. Gassemio, P. Alessi, S. Marchesini, M.B. Santos, et al., Inhibition of angiogenesis by beta-galactosylceramide deficiency in globoid cell leukodystrophy, *Brain* 136 (Pt 9) (2013) 2859–2875.
- [86] A.B. White, M.I. Givogri, A. Lopez-Rosas, H. Cao, R. van Breemen, G. Thirakara, E.R. Bongarzono, Psychosine accumulates in membrane microdomains in the brain of Krabbe patients, disrupting the raft architecture, *J. Neurosci.* 29 (19) (2009) 6068–6077.
- [87] J.A. Hawkins-Salbury, A.R. Parameswar, X. Jiang, P.H. Schlesinger, E. Bongarzono, D.S. Gory, A.V. Demchenko, M.S. Sands, Psychosine, the cytotoxic sphingolipid that accumulates in globoid cell leukodystrophy, alters membrane architecture, *J. Lipid Res.* 54 (12) (2013) 3303–3311.
- [88] S. Giri, M. Khan, N. Nath, I. Singh, A.K. Singh, The role of AMPK in psychosine mediated effects on oligodendrocytes and astrocytes: implication for Krabbe disease, *J. Neurochem.* 105 (5) (2008) 1820–1833.
- [89] M. Khan, E. Haq, S. Giri, I. Singh, A.K. Singh, Peroxisomal participation in psychosine-mediated toxicity: implications for Krabbe's disease, *J. Neurosci. Res.* 80 (6) (2005) 845–854.
- [90] B.R. Smith, M.B. Santos, M.S. Marshall, L. Cantuti-Castelvetri, A. Lopez-Rosas, G. Li, R. van Breemen, K.J. Glynn, J.L. Galles, M.S. Celey, et al., Neuronal inclusions of alpha-synuclein contribute to the pathogenesis of Krabbe disease, *J. Pathol.* 232 (5) (2014) 509–521.
- [91] R. Spiegel, G. Bach, V. Sary, G. Mengistu, B. Meiklas, S. Shalev, Y. Shneur, H. Mandel, M. Ziegler, A mutation in the saposin A coding region of the prosaposin gene in an infant presenting as Krabbe disease: first report of saposin A deficiency in humans, *Mol. Genet. Metab.* 84 (2) (2005) 160–166.
- [92] J. Matsuda, M.T. Vanier, Y. Saito, J. Tohyama, K. Suzuki, K. Suzuki, A mutation in the saposin A domain of the sphingolipid activator protein (prosaposin) gene results in a late-onset, chronic form of globoid cell leukodystrophy in the mouse, *Hum. Mol. Genet.* 10 (11) (2001) 1191–1199.
- [93] J. Matsuda, A. Yonehige, K. Suzuki, The function of sphingolipids in the nervous system: lessons learnt from mouse models of specific sphingolipid activator protein deficiencies, *J. Neurochem.* 103 (Suppl. 1) (2007) 32–38.
- [94] M.A. Simpson, H. Cross, C. Prunkakis, D.A. Priestman, D.C. Neville, G. Reindlsmeyer, H. Wang, M. Wetzlizer, K. Gortz, A. Verganelaki, et al., Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase, *Nat. Genet.* 36 (11) (2004) 1225–1229.
- [95] K. Fragaki, S. Alt-Ek-Mikadere, A. Chausseut, C. Gire, R. Mengual, L. Bressini, M. Bepietru, J.E. Ricci, V. Despujol-Durnau, V. Proccaccio, et al., Refractory epilepsy and mitochondrial dysfunction due to GM3 synthase deficiency, *Eur. J. Hum. Genet.* 21 (5) (2013) 528–534.
- [96] H. Wang, A. Bright, B. Xu, J.R. Bockover, A.S. Paller, Cutaneous dyspigmentation in patients with ganglioside GM3 synthase deficiency, *Am. J. Med. Genet. A* 161A (4) (2013) 875–879.
- [97] I. Boccardo, K. Aoki, H. Haragan-Steet, C.F. Chen, X. Fan, F. Bartel, M. Petukh, A. Pittman, R. Saul, A. Chaubey, et al., A mutation in a ganglioside biosynthetic enzyme, STGALS, results in salt & pepper syndrome, a neurocutaneous disorder with altered glycolipid and glycoprotein glycosylation, *Hum. Mol. Genet.* 23 (2) (2014) 414–433.
- [98] T. Yamashita, A. Hishiramoto, M. Hanzaki, H. Mizukami, S. Beck, A. Norton, M. Kono, S. Tsuji, J.L. Daniotti, N. Werth, et al., Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (6) (2003) 3445–3449.
- [99] K. Niimi, C. Nishioka, T. Miyamoto, F. Takahashi, I. Miyoshi, C. Kakura, T. Yamashita, Impairment of neurophysiological behaviors in ganglioside GM3-knockout mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400 (4) (2011) 524–528.
- [100] M. Yoshikawa, S. Go, K. Takasaki, Y. Kakazu, M. Obashi, M. Nagafuku, K. Kobayama, J. Sekimoto, S. Suzuki, K. Takaiwa, et al., Mice lacking ganglioside GM3 synthase exhibit complete hearing loss due to defective degeneration of the organ of Corti, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (23) (2009) 9483–9488.
- [101] A. Boukhris, R. Schulz, J.L. Loureiro, C.M. Loureiro, E. Marthwiller, M.A. Gonzalez-P. Charles, J. Gauchier, I. Bekik, R.F. Acosta Lebrigin, et al., Alteration of ganglioside biosynthesis responsible for complex hereditary spastic paraplegia, *Am. J. Hum. Genet.* 93 (1) (2013) 118–123.
- [102] P.A. Wilkison, M.A. Simpson, L. Bastaki, H. Patel, J.A. Reed, K. Khalaf, E. Samikchuk, R. Khan, T.T. Warner, A.J. Crosby, A new locus for autosomal recessive complicated hereditary spastic paraplegia (SPG26) maps to chromosome 12p11.1–12q14, *J. Med. Genet.* 42 (1) (2005) 80–82.
- [103] G.V. Harlalka, A. Lehman, B. Chioza, E.L. Bagle, K. Maronfan, H. Cross, A. Sreelaksh-Nair, D.A. Priestman, S. Al-Turki, M.E. McEntagart, et al., Mutations in B4GALNT1 (GM2 synthase) underlie a new disorder of ganglioside biosynthesis, *Brain* 136 (Pt 12) (2013) 3618–3624.
- [104] K. Takamiya, A. Yamamoto, K. Furukawa, S. Yamashiro, M. Shin, M. Okada, S. Fukumoto, M. Haraguchi, N. Taketa, H. Fujimura, et al., Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (20) (1996) 10662–10667.
- [105] K.A. Sheikh, J. Sun, Y. Liu, H. Kawai, T.O. Crawford, R.L. Proia, J.W. Griffin, R.L. Schnaar, Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (13) (1999) 7532–7537.
- [106] S. Chiavegatto, J. Sun, R.J. Nelson, R.L. Schnaar, A functional role for complex gangliosides: motor deficits in GM2/GD2 synthase knockout mice, *Exp. Neurol.* 160 (2) (2000) 227–234.
- [107] N. Branetti-Pierr, F. Scaglia, GM1 gangliosidosis: review of clinical, molecular, and therapeutic aspects, *Mol. Genet. Metab.* 94 (4) (2008) 391–396.
- [108] K. Suzuki, G.C. Chen, Brain ceramide hexosides in Tay-Sachs disease and generalized gangliosidosis (GM1-gangliosidosis), *J. Lipid Res.* 8 (2) (1967) 105–113.
- [109] K. Suzuki, S. Kamoshira, Chemical pathology of GM1-gangliosidosis (generalized gangliosidosis), *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 26 (1) (1969) 25–73.
- [110] C.N. Jahn, M. del Pilar, M. Schroder, M.T. Vanier, Y. Hara, K. Suzuki, K. Suzuki, A. d'Azzo, Generalized CNS disease and massive GM1-ganglioside accumulation in mice deficient in lysosomal acid beta-galactosidase, *Hum. Mol. Genet.* 6 (2) (1997) 205–211.
- [111] A. Tessitore, P.M.M. del R. Sano, Y. Ma, I. Mann, A. Ingrassia, E.D. Jaywell, D.A. Steinfield, L.M. Hendershot, A. d'Azzo, GM1-ganglioside-mediated activation of the unfolded protein response causes neuronal death in a neurodegenerative gangliosidosis, *Mol. Cell* 15 (5) (2004) 753–766.
- [112] A. d'Azzo, A. Tessitore, R. Sano, Gangliosides as Apoptosis signals in ER stress response, *Cell Death Differ.* 13 (3) (2006) 404–414.
- [113] A. Takamura, K. Higaki, K. Kajimaki, S. Otsuka, H. Ninomiya, J. Matsuda, K. Ohno, Y. Suzuki, E. Namba, Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine GM1-gangliosidosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367 (3) (2008) 616–622.
- [114] R. Sano, I. Athursilata, A. Patterson, S. Moshchach, E. Romero, J. Opferman, M. Fote, A. d'Azzo, GM1-ganglioside accumulation at the mitochondria-associated ER membranes links ER stress to Ca²⁺-dependent mitochondrial apoptosis, *Mol. Cell* 36 (3) (2009) 500–511.
- [115] M. Jeyakumar, R. Thomas, E. Elini-Smith, D.A. Smith, A.C. van der Spoel, A. d'Azzo, V.H. Perry, T.D. Butters, R.A. Dwek, F.M. Platt, Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis, *Brain* 126 (Pt 4) (2003) 974–987.
- [116] J.P. van der Voort, W. Kamphorst, M.S. van der Knaap, J.M. Powers, The leukoencephalopathy of infantile GM1 gangliosidosis: oligodendrocytic loss and axonal dysfunction, *Acta Neuropathol.* 107 (6) (2004) 539–545.
- [117] M. Di Rocco, A. Rossi, G. Parenti, A.E. Allegri, M. Filocamo, A. Pessagno, P. Tortori Donati, C. Minetti, R. Bianchi, Different molecular mechanisms leading to white matter hypomyelination in infantile-onset lysosomal disorders, *Neuropediatrics* 36 (4) (2005) 265–269.
- [118] M.M. Kaback, Population-based genetic screening for reproductive counseling: the Tay-Sachs disease model, *Eur. J. Pediatr.* 59 (Suppl. 3) (2000) S192–S195.
- [119] R.A. Graveel, M.M. Kaback, R.L. Proia, K. Sandhoff, K. Suzuki, K. Suzuki, The GM2 gangliosidosis, in: D. Valle (Ed.), *Scriver's OMIM* (Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease), McGraw-Hill, New York, 2009 (<http://www.omim.org>).
- [120] G.H. Maegawa, T. Stockley, M. Tropak, B. Banwell, S. Blaser, F. Kok, R. Giugliani, D. Mahajan, J.T. Clarke, The natural history of juvenile or subacute GM2 gangliosidosis: 21 new cases and literature review of 134 previously reported, *Pediatrics* 118 (5) (2006) e1550–e1562.
- [121] O. Nevalofier, G.M. Pastores, B.J. Zeng, J. Giancoso, C.M. Zaroff, E.H. Kolodny, Late-onset Tay-Sachs disease: phenotypic characterization and genotypic correlations in 21 affected patients, *Genet. Med.* 7 (2) (2005) 119–123.
- [122] R.D. Teny, M. Weiss, Studies in Tay-Sachs disease. II. Ultrastructure of the cerebellum, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 22 (1963) 18–35.
- [123] D.P. Purpura, Ectopic dendritic growth in mature pyramidal neurons in human ganglioside storage disease, *Nature* 276 (5687) (1978) 520–521.
- [124] K. Sandhoff, K. Harzer, W. Wastle, F. Jatzkewitz, Enzyme alterations and lipid storage in three variants of Tay-Sachs disease, *J. Neurochem.* 18 (12) (1971) 2469–2489.
- [125] B. Rosengren, J.E. Mansson, L. Svennerholm, Composition of gangliosides and neutral glycosphingolipids of brain in classical Tay-Sachs and Sandhoff disease: more lyso-GM2 in Sandhoff disease?, *J. Neurochem.* 49 (3) (1987) 834–840.
- [126] R.K. Yu, T. Itoh, H.C. Yohe, L.J. Macala, Characterization of some minor gangliosides in Tay-Sachs brains, *Brain Res.* 275 (1) (1983) 47–52.
- [127] K. Sandhoff, U. Andreae, H. Jatzkewitz, Deficient hexosaminidase activity in an exceptional case of Tay-Sachs disease with additional storage of kidney globoside in visceral organs, *Life Sci.* 7 (6) (1968) 263–268.

- [128] J. Gavet, M. Lallier, L. Gavet, P. Bosch, J. Champagne, F. Alvarez, Primary non-Hodgkin lymphoma of the extrahepatic biliary tract and gallbladder in a child, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 32 (5) (2001) 598–601.
- [129] P. Venugopalan, S.N. Joshi, Cardiac involvement in infantile Sandhoff disease, *J. Pediatr. Child Health* 38 (1) (2002) 98–100.
- [130] K. Sango, S. Yamanaka, A. Hoffmann, Y. Okuda, A. Günberg, H. Westphal, M.P. McDonald, J.N. Crawley, K. Sandhoff, K. Suzuki, et al., Mouse models of Tay-Sachs and Sandhoff diseases differ in neurologic phenotype and ganglioside metabolism, *Nat. Genet.* 11 (2) (1995) 170–176.
- [131] R. Wada, C.J. Tiff, R.L. Proia, Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (20) (2000) 10954–10959.
- [132] Y.P. Wu, R.L. Proia, Deletion of macrophage-inflammatory protein 1 alpha retards neurodegeneration in Sandhoff disease mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (22) (2004) 8425–8430.
- [133] S. Kyriakides, S.M. Broustou, R.H. Tallent, J.N. Miller, J.A. Olschowska, M.K. Olanow, Conditional expression of human beta-hexosaminidase in the neurons of Sandhoff disease rescues mice from neurodegeneration but not neuroinflammation, *J. Neuroinflammation* 9 (2012) 186.
- [134] G.A. Grabowski, S. Gatt, M. Horowitz, Acid beta-glucosidase: enzymology and molecular biology of Gaucher disease, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25 (6) (1990) 385–414.
- [135] G.A. Grabowski, Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease, *Lancet* 372 (9645) (2008) 1263–1271.
- [136] C. Mignot, D. Douarman, I. Maire, T.J.L. De Villeneuve, French Type 2 Gaucher Disease Study G, Type 2 Gaucher disease: 15 new cases and review of the literature, *Brain Dev.* 28 (1) (2006) 39–46.
- [137] G.M. Pastores, Neuropathic Gaucher disease, *Wien. Med. Wochenschr.* 160 (23–24) (2010) 605–608.
- [138] I. Ktana, F. Sedel, C. Caillaud, R. Fruissac, J. Sternemann, G. Chairani, H. Fodrops, S. Tari, I. Gouffier-Az, S. Machrieu, et al., A French experience of type 3 Gaucher disease: phenotypic diversity and neurological outcome of 10 patients, *Brain Dev.* 33 (2) (2011) 133–139.
- [139] A. Tybó-Szymanska, A. Vrdolá, A. El-Beshlawy, J.A. Cole, E. Kolodny, Neuropathic Gaucher disease: demographic and clinical features of 131 patients enrolled in the International Collaborative Gaucher Group Neurological Outcomes Subregistry, *J. Inher. Metab. Dis.* 33 (4) (2010) 339–346.
- [140] R.J. Tamargo, A. Welayat, E. Goldin, E. Salansky, The role of saposin C in Gaucher disease, *Mol. Genet. Metab.* 106 (3) (2012) 257–263.
- [141] O. Nilsson, G. Hakansson, S. Dreyberg, C.G. Goeth, L. Svennerholm, Increased ceramide concentration in plasma and erythrocytes in Gaucher disease: significant differences between type 1 and type III, *Clin. Genet.* 22 (5) (1982) 274–279.
- [142] E. Orvay, J.K. Park, M.E. LaMarca, E.I. Gines, B.M. Martin, N. Tayebi, E. Sidransky, Glucosylsphingosine accumulation in tissues from patients with Gaucher disease: correlation with phenotype and genotype, *Mol. Genet. Metab.* 76 (4) (2002) 262–270.
- [143] E.B. Vitner, R. Salomon, T. Farfel-Becker, A. Meshcheriakova, M. Ali, A.D. Klein, F.M. Platt, T.M. Cox, A.H. Futerman, BIPK3 as a potential therapeutic target for Gaucher's disease, *Nat. Med.* 20 (2) (2014) 204–208.
- [144] M.S. Bevan, A.H. Schapira, Glucocerebrosidase mutations and the pathogenesis of Parkinson disease, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2013) 511–521.
- [145] Y.H. Xia, K. Xu, Y. Sun, B. Liu, B. Quinn, R.H. Li, L. Xue, W. Zhang, K.D. Seuschel, D. Witte, et al., Multiple pathogenic proteins implicated in neuropathic Gaucher disease mice, *Hum. Mol. Genet.* 23 (15) (2014) 3943–3957.
- [146] M.B. Hamster, G. Fleuch-Fayache, L.V. Schottlaender, H. Nehdi, J.R. Gibbs, S.K. Arepalli, S.B. Cheng, D.G. Hernandez, A. Sailer, G. Liu, et al., Mutations in GBA2 cause autosomal-recessive cerebellar ataxia with spasticity, *Am. J. Hum. Genet.* 92 (2) (2013) 245–251.
- [147] Y. Yildiz, H. Matern, B. Thompson, J.C. Allegood, R.L. Warren, D.M. Ramirez, R.E. Hammer, F.K. Hamra, S. Matern, D.W. Russell, Mutation of beta-glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility, *J. Clin. Invest.* 116 (11) (2006) 2985–2994.
- [148] E. Martinez, R. Schüle, K. Smets, A. Rasmeyer, A. Boukhris, J.L. Lozano, M.A. Gonzalez, E. Mundwiler, T. Decozinck, M. Weisner, et al., Loss of function of glucocerebrosidase GBA2 is responsible for motor neuron defects in hereditary spastic paraplegia, *Am. J. Hum. Genet.* 92 (2) (2013) 238–244.
- [149] A.H. Futerman, G. van Meer, The cell biology of lysosomal storage disorders, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (7) (2004) 554–565.
- [150] T.M. Cox, M.B. Cachon-Gonzalez, The cellular pathology of lysosomal diseases, *J. Pathol.* 228 (2) (2012) 241–254.
- [151] F. Sabourdy, B. Kedjous, S.C. Sorli, S. Collé, D. Milhas, Y. Salma, T. Levade, Functions of sphingolipid metabolism in mammals – lessons from genetic defects, *Biochim. Biophys. Acta* 1781 (4) (2008) 145–183.
- [152] Y.H. Xu, S. Barnes, Y. Sun, G.A. Grabowski, Multi-system disorders of glycosphingolipid and ganglioside metabolism, *J. Lipid Res.* 51 (7) (2010) 1693–1675.
- [153] E.B. Vitner, F.M. Platt, A.H. Futerman, Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases, *J. Biol. Chem.* 285 (27) (2010) 20423–20427.
- [154] F.M. Platt, Sphingolipid lysosomal storage disorders, *Nature* 510 (7503) (2014) 68–75.
- [155] A.N. Moore, A.W. Kampfl, X. Zhao, R.L. Hayes, P.K. Dash, Sphingosine 1-phosphate induces apoptosis of cultured hippocampal neurons that requires protein phosphatases and activator protein-1 complexes, *Neuroscience* 94 (2) (1999) 405–415.
- [156] K. Yamagata, M. Tagami, Y. Torii, F. Takenaga, S. Tsumagari, S. Itoh, Y. Yamori, Y. Nara, Sphingosine 1-phosphate induces the production of glial cell line-derived neurotrophic factor and cellular proliferation in astrocytes, *Glia* 41 (2) (2003) 189–206.
- [157] A. Furukawa, K. Kita, M. Toyomasa, S. Fujii, S. Inoue, K. Hayashi, K. Ikeda, Production of nerve growth factor enhanced in cultured mouse astrocytes by glycerophospholipids, sphingolipids, and their related compounds, *Mol. Cell. Biochem.* 305 (1–2) (2007) 27–34.
- [158] J. Van Brocklyn, C. Letterle, P. Snyder, T. Prior, Sphingosine-1-phosphate stimulates human glioma cell proliferation through G_i-coupled receptors: role of ERK/MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase beta, *Cancer Lett.* 181 (2) (2002) 195–204.
- [159] V. Anelli, C.R. Garik, A.J. Snider, J.M. Obeid, Role of sphingosine kinase-1 in paracrine/transcellular angiogenesis and lymphangiogenesis in vitro, *FASEB J.* 24 (8) (2010) 2722–2738.
- [160] A. Kimura, T. Ohmori, R. Ohkawa, S. Matsuwa, J. Mizuno, T. Murakami, E. Kobayashi, Y. Hoshino, Y. Yamori, Y. Sakata, Essential roles of sphingosine 1-phosphate/S1P1 receptor axis in the migration of neural stem cells toward a site of spinal cord injury, *Stem Cells* 25 (1) (2007) 115–124.
- [161] V.R. Silva, T.O. Micheletti, G.D. Pimentel, C.K. Kawahira, L. Leharé, J. Moraes, M.C. Mendes, D.S. Razzilli, G.Z. Rocha, C.T. de Souza, et al., Hypothalamic 51P/31P1 axis controls energy homeostasis, *Nat. Commun.* 5 (2014) 4059.
- [162] G. Marfa, R. Campanella, S.E. Navone, C. Di Vito, E. Ricciuti, L.A. Faddi, A. Bormaci, G. de Rendele, P. Giassari, C. Tringali, et al., Autocrine/paracrine sphingosine 1-phosphate Euk1 proliferative and stemness qualities of glioblastoma stem cells, *Glia* 62 (12) (2014) 1966–1981.
- [163] S. Shirao, S. Kasahara, M. Sato, S. Miwa, F. Naka, T. Rurokawa, N. Todoroki-Iweda, K. Mogami, Y. Mizukami, S. Kuriyama, et al., Sphingosylphosphorylcholine is a novel messenger for Rho-kinase-mediated Ca²⁺ sensitization in the bovine cerebral artery: unimportant role for protein kinase C, *Circ. Res.* 91 (2) (2002) 112–119.
- [164] D.M. Hodgson, A.N. Taylor, Z. Zhang, A. Rosenberger, Lysophosphorylcholine prevents behavioral aberrations and hippocampal neuron loss induced by the metabotropic glutamate receptor agonist quisqualate, *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 23 (5) (1999) 877–892.
- [165] A. Ignatov, J. Lintzel, I. Hermans-Borgmeyer, H.J. Kreienkamp, P. Jost, S. Thomsen, A. Methner, H.C. Schaller, Role of the G-protein-coupled receptor GPR12 as a high-affinity receptor for sphingosylphosphorylcholine and its expression and function in brain development, *J. Neurosci.* 23 (3) (2003) 907–914.
- [166] N. Chizzoli, F. Codazzi, A. Di Cesare, C. Gravagli, D. Zaccchetti, E. Grubisic, Sphingosylphosphocholine effects on cultured astrocytes reveal mechanisms potentially involved in neurotoxicity in Niemann-Pick type A disease, *Eur. J. Neurosci.* 26 (4) (2007) 875–881.
- [167] A. Titievskaya, I. Titievskaya, M. Pasternack, K. Kaila, K. Tornquist, Sphingosine inhibits voltage-operated calcium channels in GH4C1 cells, *J. Biol. Chem.* 273 (1) (1998) 242–247.
- [168] T. Kanno, T. Nishizaki, Sphingosine induces apoptosis in hippocampal neurons and astrocytes by activating caspase-3/9 via a mitochondrial pathway linked to SDR/14-3-3 protein/Bax/cytochrome c, *J. Cell. Physiol.* 226 (9) (2011) 2329–2337.
- [169] D.M. Hodgson, A.N. Taylor, Z. Zhang, A. Rosenberger, Psychosine blocks quisqualate-induced glutamate excitotoxicity in hippocampal CA1 sector neurons, *Brain Res.* 802 (1–2) (1998) 1–8.
- [170] M. Jitana, S. Giri, A.K. Singh, Apoptotic positive cells in Krabbe brain and induction of apoptosis in rat C6 glial cells by psychosine, *Neurosci. Lett.* 330 (2) (2002) 183–187.
- [171] L. Cantuti-Castelvetri, M.I. Givogri, A. Hebert, B. Smith, Y. Song, A. Kaminska, A. Lopez-Rosas, G. Morfini, G. Pigini, M. Sands, et al., The sphingolipid psychosine inhibits fast axonal transport in Krabbe disease by activation of GSK3 β and deregulation of molecular motors, *J. Neurosci.* 33 (24) (2013) 10040–10056.
- [172] E. Lloyd-Evans, D. Pelled, C. Riebeling, J. Bodenec, A. de-Morgan, H. Waller, R. Schiffmann, A.H. Futerman, Glucosylceramide and glucosylsphingosine modulate calcium mobilization from brain microsomes via different mechanisms, *J. Biol. Chem.* 278 (26) (2003) 23594–23599.
- [173] U.H. Schwoeler, T. Kolter, C.R. Kateski, J.K. Blustajn, M. Herkenham, K. Sandhoff, R.O. Brady, Toxicity of glucosylsphingosine (glucosylpsychosine) to cultured neuronal cells: a model system for assessing neuronal damage in Gaucher disease type 2 and 3, *Neurobiol. Dis.* 14 (3) (2003) 595–601.
- [174] L. Riboni, A. Prinetti, R. Baris, A. Caminiti, G. Tetramanti, A mediator role of ceramide in the regulation of neuroblastoma Neuro2A cell differentiation, *J. Biol. Chem.* 270 (45) (1995) 26868–26875.
- [175] I. Galve-Roperch, C. Sanchez, M.L. Cortes, T. Gomez del Pulgar, M. Izquierdo, M. Guzman, Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation, *Nat. Med.* 6 (3) (2000) 313–319.
- [176] Y. Chen, I. Glinz, J.M. Hallenbeck, The protective effect of ceramide in immature rat brain hypoxia-ischemia involves up-regulation of bcl-2 and reduction of TUNEL-positive cells, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21 (1) (2001) 34–40.
- [177] S. Daiko, T. Kanazawa, A. Yamamoto, H. Takeuchi, Y. Kondo, S. Kondo, Pivotal role of the cell death factor Bnip3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells, *Cancer Res.* 64 (12) (2004) 4286–4293.
- [178] M. Salazar, A. Carracedo, I.J. Salameva, S. Hernandez-Tiedra, M. Lorenzo, A. Egia, P. Vazquez, C. Blanquez, S. Torres, S. Garcia, et al., Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells, *J. Clin. Invest.* 119 (5) (2009) 1359–1372.
- [179] B.M. Alizadeh, A. Gehrewski, T. Zheng, B.T. Alizadeh, Sphingomyelinase and ceramide analogs induce vasoconstriction and leukocyte-endothelial interactions in cerebral venules in the intact rat brain: insight into mechanisms and possible relation to brain injury and stroke, *Brain Res. Bull.* 58 (3) (2002) 271–279.
- [180] E. Guilbins, M. Palmaada, M. Reichel, A. Luch, C. Bohmer, D. Amato, C.P. Müller, C.H. Tschöbner, T.W. Groemer, G. Tahatahai, et al., Acid sphingomyelinase-ceramide system mediates effects of antidepressant drugs, *Nat. Med.* 19 (7) (2013) 934–938.

- [181] V. Koca, V.M. Dhopole, G. Fullbright, N.M. Smythe, Z.M. Szak, A. Bielawska, H. Kama, 2'-hydroxy C16-ceramide induces apoptosis-associated proteomic changes in C6 glioma cells, *J. Proteome Res.* 12 (10) (2013) 4366–4375.
- [182] M. Foyarón, H. Manry, H. Alho, M. Bertolino, B. Ferrer, A. Guidotti, E. Costa. Gangliosides prevent glutamate and kainate neurotoxicity in primary neuronal cultures of neonatal rat cerebellum and cortex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (19) (1988) 7351–7355.
- [183] L. Barrier, G. Page, S. Barc, A. Pinou, J. Pietrucciakian. Sulfatide and GM1 ganglioside modulate the high-affinity dopamine uptake in rat striatal synaptosomes: evidence for the involvement of their ionic charges, *Neurochem. Int.* 42 (4) (2003) 305–313.
- [184] J. Prendergast, G.R. Limanah, S.W. Yoo, O. Lagerhof, M.G. Motari, B.N. Cole, R.L. Huganir, T.M. Dawson, V.L. Dawson, R.L. Schnaar. Ganglioside regulation of AMPA receptor trafficking, *J. Neurosci.* 34 (39) (2014) 13246–13258.
- [185] S.U. Walldley, M. Zervas, S. Wiseman. Gangliosides as modulators of dendritogenesis in normal and storage disease-affected pyramidal neurones, *Cereb. Cortex* 10 (10) (2000) 1028–1037.

RÉFÉRENCES

- 1 Aarntzen, E.H. et al., 'Vaccination with mRNA-electroporated dendritic cells induces robust tumor antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells responses in stage III and IV melanoma patients.', *Clinical Cancer Research*, 18 (2012), 5460-5470.
- 2 Abbas, A.K., et al., 'Functional diversity of helper T lymphocytes.', *Nature*, 383 (1996), 787–793.
- 3 Adatia, R. et al. , 'Suppression of invasive behavior of melanoma cells by stable expression of anti-sense perlecan cDNA. ', *Annals Of Oncology*, 8 (1997), 1257-1261.
- 4 Ader, I. et al., 'Sphingosine kinase 1: A new modulator of hypoxia inducible factor 1alpha during hypoxia in human cancer cells. ', *Cancer Research*, 68 (2008), 8635–8642.
- 5 Afkarian, M. et al., 'T-bet is a STAT1-induced regulator for IL-12R expression in naïve CD4+ T cells.', *Nature Immunology*, 3 (2002), 549–557.
- 6 Agarwala, S.S., and Kirkwood, J.M. , 'Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma.', *Oncologist*, 5 (2000), 144-151.
- 7 Airola, K. et al. , 'Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas.', *British Journal Of Cancer*, 80 (1999), 733-743.
- 8 Akhurst, R.J. , and Hata, A., 'Targeting the TGFβ signalling pathway in disease.', *Nature Reviews Drug Discovery*, 11 (2012), 790–811.
- 9 Albelda, S.M., et al., 'Integrin distribution in malignant melanoma: Association of the beta 3 subunit with tumor progression.', *Cancer Research*, 50 (1990), 6757-6764.
- 10 Albinet, V. et al., 'Dual role of sphingosine kinase-1 in promoting the differentiation of dermal fibroblasts and the dissemination of melanoma cells.', *Oncogene*, 33 (2014), 3364-3373.
- 11 Allende, M.L. et al., 'Sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 regulates keratinocyte differentiation and epidermal homeostasis.', *Journal Of Biological Chemistry*, 288 (2013), 18381–18391.
- 12 Almholt, K. et al., 'Reduced metastasis of transgenic mammary cancer in urokinase-deficient mice.', *International Journal Of Cancer*, 113 (2005), 525–532.
- 13 Alshaker, H., et al., 'Therapeutic potential of targeting SK1 in human cancers.', *Advances in Cancer Research*, 117 (2013), 143-200.
- 14 Alvarez, R.H. et al. , 'Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease.', *Mayo Clinic Proceedings*, 81 (2006), 1241–1257.
- 15 Alvarez, S.E. et al. , 'Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. ', *Nature*, 465 (2010), 1084–1088.

- 16 Alvarez, S.E., et al., 'Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate.', *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 18 (2007), 300–307.
- 17 'American, Cancer, and Society, Cancer Facts and figures. ', (2013).
- 18 An, S. , et al., 'Sphingosine 1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5.', *Journal Of Biological Chemistry*, 275 (2000), 288-296.
- 19 Ancellin, N. , and Hla, T., 'Differential pharmacological properties and signal transduction of the sphingosine 1-phosphate receptors EDG-1, EDG-3, and EDG-5.', *Journal Of Biological Chemistry*, 274 (1999), 18997-19002.
- 20 Andreu, P. et al. , 'FcR γ Activation Regulates Inflammation-Associated Squamous Carcinogenesis', *Cancer Cell*, 17 (2010), 121–134
- 21 Antoon, J. W. et al., 'Targeting NF-kB mediated breast cancer chemoresistance through selective inhibition of sphingosine kinase-2.', *Cancer Biology & Therapy*, 11 (2011), 678–689.
- 22 Antoon, J.W. et al., 'Antiestrogenic effects of the novel sphingosine kinase-2 inhibitor ABC294640.', *Endocrinology*, 151 (2010), 5124–5135.
- 23 Arenberg, D.A. et al., 'Macrophage infiltration in human non-small-cell lung cancer: The role of CC chemokines.', *Cancer Immunology Immunotherapy*, 49 (2000), 63–70.
- 24 Arikawa, K. et al., 'Ligand-dependent inhibition of B16 melanoma cell migration and invasion via endogenous S1P2 G protein-coupled receptor. Requirement of inhibition of cellular RAC activity. ', *Journal Of Biological Chemistry*, 278 (2003), 32841–32851.
- 25 Arnaout, M.A. , et al., 'Coming to grips with integrin binding to ligands. ', *Current Opinion In Cell Biology*, 14 (2002), 641-651.
- 26 Artal-Sanz, M. , and Tavernarakis, N. , 'Prohibitin and mitochondrial biology.', *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 20 (2009), 394–401.
- 27 Ascierto, P. A. et al. , 'Phase II trial (BREAK-2) of the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436) in patients with metastatic melanoma. ', *Journal Of Clinical Oncology*, 31 (2013), 3205–3211.
- 28 Ashcroft, G.S., 'Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta.', *Microbes And Infection*, 1 (1999), 1275-1282.
- 29 Awad, A.S. et al., 'Selective sphingosine 1-phosphate 1 receptor activation reduces ischemia-reperfusion injury in mouse kidney. ', *American Journal Of Physiology-Renal Physiology*, 290 (2006), F1516-F1524.
- 30 Azuma, M. et al. , 'B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28.', *Nature*, 366 (1993), 76-79.
- 31 Baecher-Allan, C. , and Hafler, D.A., 'Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease.', *Immunological Reviews*, 212 (2006), 203–216.
- 32 Bailey, S.R. et al., 'Th17 cells in cancer: The ultimate identity crisis.', *Frontiers in Immunology*, 5 (2014), 276.

- 33 Bak, S.P., et al., 'Scavenger receptor-A-targeted leukocyte depletion inhibits peritoneal ovarian tumor progression', *Cancer Research*, 67 (2007), 4783–4789.
- 34 Balkwill, F. , 'Cancer and the chemokine network.', *Nature Reviews Cancer*, 4 (2004), 540–550.
- 35 Bandhuvula, P. , and Saba, J.D., 'Sphingosine-1-phosphate lyase in immunity and cancer: silencing the siren.', *Trends In Molecular Medicine*, 13 (2007), 210-217.
- 36 Banno, Y. et al., 'Evidence for the presence of multiple forms of Sph kinase in human platelets.', *Biochemical Journal*, 335 (1998), 301.
- 37 Bates, G.J. et al., 'Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse.', *Journal Of Clinical Oncology*, 24 (2006), 5373–5380.
- 38 Battle, E. , et al., 'The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. ', *Nature Cell Biology*, 2 (2000), 84-89.
- 39 Bektas, M. et al., 'Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: Role of Bcl-2 expression. ', *Oncogene*, 24 (2005), 178–187.
- 40 Beljanski, V., et al., 'A novel sphingosine kinase inhibitor induces autophagy in tumor cells.', *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 333 (2010), 454–464.
- 41 Benbow, U. et al. , 'A novel host/tumor cell interaction activates matrix metalloproteinase 1 and mediates invasion through type I collagen.', *Journal Of Biological Chemistry*, 274 (1999), 25371-25378.
- 42 Bergers, G., and Song, S. , 'The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. ', *Neuro-Oncology*, 7 (2005), 452-464.
- 43 Berking, C. et al. , 'Transforming growth factor-beta1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling. ', *Cancer Research*, 61 (2001), 8306-8316.
- 44 Berking, C., et al., 'Transforming growth factor-β1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling.', *Cancer Research*, 61 (2001), 8306-8316.
- 45 Besser, M.J. et al., 'Development of allogeneic NK cell adoptive transfer therapy in metastatic melanoma patients: in vitro preclinical optimization studies. ', *PLOS ONE*, 8 (2013), e57922.
- 46 Bettelli, E. et al., 'Induction and effector functions of T_H17 cells.', *Nature*, 453 (2008), 1051–1057.
- 47 Bettelli, E. et al. , 'Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells.', *Nature*, 441 (2006), 235–238.
- 48 Bhatt, K.V. , et al., 'Adhesion control of cyclin D1 and p27Kip1 levels is deregulated in melanoma cells through BRAF-MEK-ERK signaling.', *Oncogene*, 24 (2005), 3459-3471.
- 49 Bichakjian, C.K. , et al., 'Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma.', *Journal of American Academy of Dermatology*, 65 (2011), 1032-1047.

- 50 Billich, A. , et al., 'Basal and induced sphingosine kinase 1 activity in A549 carcinoma cells: function in cell survival and IL-1beta and TNF-alpha induced production of inflammatory mediators.', *Cellular Signalling*, 17 (2005), 1203-1217.
- 51 Bingle, L., et al., 'Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo.', *British Journal Of Cancer*, 94 (2006), 101-107.
- 52 Biswas, S.K. , and Mantovani, A., 'Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. ', *Nature Immunology*, 11 (2010), 889-896.
- 53 Bolego, C. , et al., 'Macrophage Function and Polarization in Cardiovascular Disease A Role of Estrogen Signaling?', *Arteriosclerosis Thrombosis And Vascular Biology*, 33 (2013), 1127-1134.
- 54 Bolos, V. , et al., 'The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: A comparison with Snail and E47 repressors. ', *Journal Of Cell Science*, 116 (2003), 499-511.
- 55 Bonhoure, E. et al., 'Overcoming MDR-associated chemoresistance in HL-60 acute myeloid leukemia cells by targeting sphingosine kinase-1. ', *Leukemia*, 20 (2006), 95-102.
- 56 Bonhoure, E. et al., 'Sphingosine kinase-1 is a downstream regulator of imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells.', *Leukemia*, 22 (2008), 971-979.
- 57 Bonizzi, G., and Karin, M., 'The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity.', *Trends In Immunology*, 25 (2004), 280-288.
- 58 Boon, T. , et al., 'Human T cell responses against melanoma. ', *Annual Review Of Immunology*, 24 (2006), 175-208.
- 59 Borden, E.C., et al., 'Dual mechanistic function of MDSC subsets in melanoma resistance. ', *Journal Of Clinical Oncology*, 28 (2010).
- 60 Botti, G., et al., 'Microenvironment and tumor progression of melanoma: New therapeutic perspectives', *Journal of Immunotoxicology*, 10 (2013), 235-252.
- 61 Bottino, C. et al., 'Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule.', *Journal Of Experimental Medicine*, 198 (2003), 557-567.
- 62 Boutaud, A. et al. , 'Type IV collagen of the glomerular basement membrane. Evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the non-collagenous NC1 domains.', *Journal Of Biological Chemistry*, 275 (2000), 30716-30724.
- 63 Braeuer, R.R. , et al., 'Transcriptional control of melanoma metastasis: Importance of the tumor microenvironment.', *Seminars in Cancer Biology*, 21 (2011), 83-88.
- 64 Brakebusch, C. , et al., 'Integrins in invasive growth. ', *Journal Of Clinical Investigation*, 109 (2002), 999-1006.
- 65 Brandt, C.S. et al., 'The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans.', *Journal Of Experimental Medicine*, 206 (2009), 1495-1503.

- 66 Braumüller, H., 'T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence.', *Nature*, 494 (2013), 361-365.
- 67 Brekken, R.A., et al., 'Enhanced growth of tumors in SPARC null mice is associated with changes in the ECM. ', *Journal Of Clinical Investigation*, 111 (2003), 487-495.
- 68 Brewer, J.D. , et al., 'Malignant melanoma in solid transplant recipients: collection of database cases and comparison with surveillance, epidemiology, and end results data for outcome analysis. ', *Archives Of Dermatology*, 147 (2011), 790-796.
- 69 Bricca, G.M. , et al., 'Immunostaining melanoma frozen sections: the 1-hour protocol.', *Dermatologic Surgery*, 30 (2004), 403-408.
- 70 Brinkmann, V. et al., 'The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors.', *Journal Of Biological Chemistry*, 277 (2002), 21453–21457.
- 71 Brocker, E.B. et al. , 'Inflammatory cell infiltrates in human melanoma at different stages of tumor progression.', *International Journal Of Cancer*, 41 (1988), 562-567.
- 72 Bruchard, M. et al. , 'Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth.', *Nature Medicine*, 19 (2013), 57-64.
- 73 Bruno, A.P. et al., 'Lack of ceramide generation in TF-1 human myeloid leukemic cells resistant to ionizing radiation.', *Cell Death And Differentiation*, 5 (1998), 172–182.
- 74 Bruno, G. , et al., 'CTGF/CCN2 exerts profibrotic action in myoblasts via the up-regulation of sphingosine kinase-1/S1P3 signaling axis: Implications in the action mechanism of TGFβ.', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1851 (2015), 194-202.
- 75 Bryceson, Y.T. , et al., 'Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells.', *Immunological Reviews*, 214 (2006), 73–91.
- 76 Bryceson, Y.T., and Long, E.O., 'Line of attack: NK cell specificity and integration of signals.', *Current Opinion In Immunology*, 20 (2008), 344–352.
- 77 Bunt, S.K. et al. , 'Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression.', *Cancer Research*, 67 (2007), 10019-10026.
- 78 Burgess, S.J. et al., 'The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications.', *Immunologic Research*, 40 (2008), 18–34.
- 79 Burke, B. et al., 'Expression of HIF-1alpha by human macrophages: Implications for the use of macrophages in hypoxia-regulated cancer gene therapy. ', *Journal Of Pathology*, 196 (2002), 204–212.
- 80 Burke, B. et al., 'Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: Implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy.', *American Journal Of Pathology*, 163 (2003), 1233–1243.
- 81 Burke, S., et al., 'New views on natural killer cell based immunotherapy for melanoma treatment.', *Trends In Immunology*, 31 (2010), 339–345.

- 82 Busca, R. et al., 'Hypoxia-inducible factor 1 {alpha} is a new target of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in melanoma cells. ', *The Journal Of Cell Biology*, 170 (2005), 49-59.
- 83 Busse, A., and Keilholz, U., 'Role of TGF-beta in melanoma.', *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12 (2011), 2165-2175.
- 84 Butler, M.O. et al., 'Establishment of antitumor memory in humans using in vitro-educated CD8+ T cells.', *Science Translational Medicine*, 3 (2011), 80ra34.
- 85 Byrd, A. et al., 'Expression analysis of the ligands for the natural killer cell receptors NKp30 and NKp44.', *PLOS ONE*, 2 (2007), e1339.
- 86 Cagnano, E. et al., 'Expression of ligands to NKp46 in benign and malignant melanocytes.', *Journal Of Investigative Dermatology*, 128 (2008), 972-979.
- 87 Cano, A. , et al., 'The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. ', *Nature Cell Biology*, 2 (2000), 76-83.
- 88 Cantwell-Dorris, E.R., et al., 'BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. ', *Molecular Cancer Therapeutics*, 10 (2011), 385-394.
- 89 Cao, Z., et al., 'Role of Kruppel-like factors in leukocyte development, function, and disease.', *Blood*, 116 (2010), 4404-4414.
- 90 Carlsten, M. et al., 'Primary human tumor cells expressing CD155 impair tumor targeting by down-regulating DNAM-1 on NK cells.', *Journal Of Immunology*, 183 (2009), 4921-4930.
- 91 Carlsten, M. et al., 'Reduced DNAM-1 expression on bone marrow NK cells associated with impaired killing of CD34+ blasts in myelodysplastic syndrome. ', *Leukemia*, 24 (2010), 1607-1616.
- 92 Carmeliet, P., and Jain, R.K. , 'Angiogenesis in cancer and other diseases. ', *Nature*, 407 (2000), 249-257.
- 93 Carnahan, J. et al. , 'Selective and potent Raf inhibitors paradoxically stimulate normal cell proliferation and tumor growth.', *Molecular Cancer Therapeutics*, 9 (2010), 2399-2410.
- 94 Carrega, P. et al., 'Susceptibility of human melanoma cells to autologous natural killer (NK) cell killing: HLA-related effector mechanisms and role of unlicensed NK cells.', *PLOS ONE*, 4 (2009), e8132.
- 95 Carreno, B.M. et al. , 'IL-12p70-producing patient DC vaccine elicits Tc1-polarized immunity. ', *Journal Of Clinical Investigation*, 123 (2013), 3383-3394.
- 96 Carvajal, R.D., 'KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. ', *JAMA*, 305 (2011), 2327.
- 97 Casado, J.G. et al., 'Expression of adhesion molecules and ligands for activating and costimulatory receptors involved in cell-mediated cytotoxicity in a large panel of human melanoma cell lines. ', *Cancer Immunology Immunotherapy*, 58 (2009), 1517-1526.
- 98 Casazza, A. et al., 'Impeding macrophage entry into hypoxic tumor areas by Sema3A/Nrp1 signaling blockade inhibits angiogenesis and restores antitumor immunity.', *Cancer Cell*, 24 (2013), 695-709.

- 99 Castermans, K. et al., 'Angiostatic activity of the antitumor cytokine interleukin-21.', *Blood*, 112 (2008), 4940–4947.
- 100 Cencetti, F. , et al., 'Transforming growth factor-beta1 induces transdifferentiation of myoblasts into myofibroblasts via up-regulation of sphingosine kinase-1/S1P3 axis.', *Molecular And Cellular Biology*, 21 (2010), 1111-1124.
- 101 Ceradini, D.J. et al., 'Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1.', *Nature Medicine*, 10 (2004), 858–864.
- 102 Chae, S.S. et al., 'Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference.', *Journal Of Clinical Investigation*, 114 (2004), 1082–1089.
- 103 Chalasani, G. , and Rothstein, D.M. , 'Non-antibody mediated roles of B cells in allograft survival.', *Current Transplantation Reports*, 1 (2014), 155–165.
- 104 Chalmin, F. et al. , 'Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression.', *Immunity*, 36 (2012) , 362-373.
- 105 Champsaur, M. , and Lanier, L.L., 'Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses.', *Immunological Reviews*, 235 (2010), 267–285.
- 106 Chan, C.J. et al., 'DNAM-1/CD155 interactions promote cytokine and NK cell-mediated suppression of poorly immunogenic melanoma metastases.', *Journal Of Immunology*, 184 (2010), 902–911.
- 107 Chapman, P.B. et al., 'Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. ', *New England Journal Of Medicine*, 364 (2011), 2507-2516.
- 108 Chapman, P.B. et al., 'Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. ', *Journal Of Clinical Oncology*, 17 (1999), 2745-2751.
- 109 Chaput, N. , et al., 'The Janus face of dendritic cells in cancer', *Oncogene*, 27 (2008), 5920–5931.
- 110 Chelberg, M.K. , et al., 'Type IV collagen-mediated melanoma cell adhesion and migration: involvement of multiple, distinct domains of the collagen molecule. ', *Cancer Research*, 49 (1989), 4796–4802.
- 111 Chen, G. , and Goeddel, D.V. , 'TNF-R1 signaling: a beautiful pathway.', *Science*, 296 (2002), 1634-1635.
- 112 Chen, P. et al., 'Tumor-associated macrophages promote angiogenesis and melanoma growth via adrenomedullin in a paracrine and autocrine manner.', *Clinical Cancer Research*, 17 (2011), 7230–7239.
- 113 Chen, W.V. et al. , 'Identification and validation of PDGF transcriptional targets by microarray-coupled gene-trap mutagenesis. ', *Nature Genetics*, 36 (2004), 304–312.
- 114 Chi, H. , and Flavell, R. , 'Regulation of T cell trafficking and primary immune responses by sphingosine 1-phosphate receptor 1.', *Journal Of Immunology*, 174 (2005), 2485–2488.

- 115 Chiba, K. et al. , 'FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. ', *Journal Of Immunology*, 160 (1998), 5037–5044.
- 116 Chiodoni, C., et al., 'Matricellular proteins: From homeostasis to inflammation, cancer, and metastasis.', *Cancer and Metastasis Reviews*, 29 (2010), 295–307.
- 117 Chlenski, A., and Cohn, S.L. , 'Modulation of matrix remodeling by SPARC in neoplastic progression. ', *Seminars In Cell & Developmental Biology*, 21 (2010), 55-65.
- 118 Chmura, S.J. et al., 'Loss of ceramide production confers resistance to radiation-induced apoptosis.', *Cancer Research*, 57 (1997), 1270–1275.
- 119 Chumanevich, A.A. et al., 'Suppression of colitis-driven colon cancer in mice by a novel small molecule inhibitor of sphingosine kinase.', *Carcinogenesis*, 31 (2010), 1787–1793.
- 120 Clark, W.H. , et al., 'A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. ', *Human Pathology*, 15 (1984), 1147-1165.
- 121 Clark, W.H. et al. , 'Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression.', *Journal Of The National Cancer Institute*, 81 (1989), 1893–1904.
- 122 Clarke, M.F., 'Neurobiology: At the root of brain cancer.', *Nature*, 432 (2004), 281–282.
- 123 Clemente, C.G. et al. , 'Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. ', *Cancer*, 77 (1996), 1303-1310.
- 124 Coffelt, S.B. et al., 'Angiopoietin-2 regulates gene expression in TIE2-expressing monocytes and augments their inherent proangiogenic functions.', *Cancer Research*, 70 (2010), 5270–5280.
- 125 Cohen, I.R. et al. , 'Abnormal expression of perlecan proteoglycan in metastatic melanomas. ', *Cancer Research*, 54 (1994), 5771-5774.
- 126 Colie, S. et al. , 'Disruption of sphingosine 1-phosphate lyase confers resistance to chemotherapy and promotes oncogenesis through Bcl-2/Bcl-xL upregulation.', *Cancer Research*, 69 (2009), 9346-9353.
- 127 Colognato, H. , and Yurchenko, P.D. , 'Form and function: the laminin family of heterotrimers. ', *Developmental Dynamics*, 218 (2000), 213-234.
- 128 Colombo, M.P., and Mantovani, A., 'Targeting myelomonocytic cells to revert inflammation-dependent cancer promotion.', *Cancer Research*, 65 (2005), 9113-9116.
- 129 Condamine, T. , and Gabrilovich, D.I. , 'Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function.', *Trends In Immunology*, 32 (2011), 19-25.
- 130 Connolly, E.C. , and Akhurst, R.J. , 'The complexities of TGF-beta action during mammary and squamous cell carcinogenesis.', *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12 (2011), 2138-2149.
- 131 Curiel, T.J. et al., 'Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival.', *Nature Medicine*, 10 (2004), 942–949.

- 132 Curran, M.A. , et al., 'PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. ', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (2010), 4275-4280.
- 133 Cust, A.E., et al., 'MC1R genotypes and risk of melanoma before age 40 years: a population-based case-control-family study.', *International Journal Of Cancer*, 131 (2012), 269-281.
- 134 Cuvillier, O. et al. , 'Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate.', *Nature*, 381 (1996), 800–803.
- 135 Dalton, H.J. et al., 'Monocyte subpopulations in angiogenesis.', *Cancer Research*, 74 (2014), 1287–1293.
- 136 Dankbar, B. et al. , 'Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma.', *Blood*, 95 (2000), 2630-2636.
- 137 Dannenberg, J.H. et al. , 'mSin3A corepressor regulates diverse transcriptional networks governing normal and neoplastic growth and survival. ', *Genes & Development*, 19 (2005), 1581–1595.
- 138 Davies, H. , et al., 'Mutations of the BRAF gene in human cancer.', *Nature*, 417 (2002), 949–954.
- 139 Davis-Dusenbery, B.N. , and Hata, A. , 'Smad-mediated miRNA processing: a critical role for a conserved RNA sequence. ', *RNA Biology*, 8 (2011), 71–76
- 140 Davis, M.D. et al., 'Sphingosine 1-phosphate analogs as receptor antagonists.', *Journal Of Biological Chemistry*, 280 (2005), 9833–9841.
- 141 De Palma, M. et al., 'Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors.', *Cancer Cell*, 8 (2005), 211–226.
- 142 DeClerck, Y.A. et al. , 'Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases.', *Cancer Research*, 52 (1992), 701-708.
- 143 Delon, C. et al. , 'Sphingosine kinase 1 is an intracellular effector of phosphatidic acid.', *Journal Of Biological Chemistry*, 279 (2004), 44763–44774.
- 144 DeNardo, D.G. et al. , 'CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages.', *Cancer Cell*, 16 (2009), 91–102
- 145 Deng, J. et al. , 'S1PR1-STAT3 signaling is crucial for myeloid cell colonization at future metastatic sites. ', *Cancer Cell*, 21 (2012), 642-654.
- 146 Di Carlo, E., et al., 'The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in anti-tumor reactions.', *Blood*, 97 (2001), 339-345.
- 147 Dick, J.E., 'Stem cell concepts renew cancer research. ', *Blood*, 112 (2008), 4793–4807.
- 148 Diederichsen, A.C.P. et al., 'Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. ', *Cancer Immunology Immunotherapy*, 52 (2003), 423–428.

- 149 Dinarello, C.A. , 'Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family.', *Annual Review Of Immunology*, 27 (2009), 519–550.
- 150 Ding, G. et al. , 'Protein kinase D-mediated phosphorylation and nuclear export of sphingosine kinase 2.', *Journal Of Biological Chemistry*, 282 (2007), 27493–27502.
- 151 Doll, F., et al., 'Prolactin upregulates sphingosine kinase-1 expression and activity in the human breast cancer cell line MCF7 and triggers enhanced proliferation and migration. ', *Endocrine-Related Cancer*, 14 (2007), 325–335.
- 152 Donati, C. et al. , 'TGFbeta protects mesoangioblasts from apoptosis via sphingosine kinase-1 regulation.', *Cellular Signalling*, 21 (2009), 228-236.
- 153 Donskov, F., 'Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinical trials.', *Seminars in Cancer Biology*, 23 (2013), 200-207.
- 154 Dorner, B.G. et al., 'Coordinate expression of cytokines and chemokines by NK cells during murine cytomegalovirus infection.', *Journal Of Immunology*, 172 (2004), 3119–3131.
- 155 Dorsam, G. et al. , 'Transduction of multiple effects of sphingosine 1-phosphate (S1P) on T cell functions by the S1P1 G protein-coupled receptor. ', *Journal Of Immunology*, 171 (2003), 3500–3507.
- 156 Dorsch, M., et al., 'Macrophage colony-stimulating factor gene transfer into tumor cells induces macrophage infiltration but not tumor suppression.', *European Journal Of Immunology*, 23 (1993), 186–190.
- 157 Dougan, M. , and Dranoff, G., 'Immune therapy for cancer. ', *Annual Review Of Immunology*, 27 (2009), 83-117.
- 158 Du, J. , et al., 'Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF.', *Cancer Cell*, 6 (2004), 565-576.
- 159 Du, J., et al., 'MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma.', *American Journal Of Pathology*, 163 (2003), 333-343.
- 160 Du, R. et al., 'HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion.', *Cancer Cell*, 13 (2008), 206–220.
- 161 Duan, H.F. et al. , 'Sphingosine kinase activation regulates hepatocyte growth factor induced migration of endothelial cells. ', *Experimental Cell Research*, 298 (2004), 593–601.
- 162 Dueñas, A.I. et al. , 'Selective attenuation of Toll-like receptor 2 signaling may explain the atheroprotective effect of sphingosine 1-phosphate. ', *Cardiovascular Research*, 79 (2008), 537–544.
- 163 Duhén, T. et al., 'Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells.', *Nature Immunology*, 10 (2009), 857–863.
- 164 Dumitru, C.A. et al., 'Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. ', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61 (2012), 1155-1167.

- 165 Dumitru, C.A., et al., 'Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironment: mechanisms and consequences for tumor progression.', *Seminars in Cancer Biology*, 23 (2013), 141–148
- 166 Dummer, R. , et al., 'Melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. ', *Annals Of Oncology*, 21 (2010), 194-197.
- 167 Dummer, R. , et al., 'Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. ', *Annals Of Oncology*, 23 (2012), 86-91.
- 168 Dummer, R. et al. , 'Initial results from a phase I, open-label, dose escalation study of the oral BRAF inhibitor LGX818 in patients with BRAF V600 mutant advanced or metastatic melanoma.', *Journal Of Clinical Oncology*, 31 (2013), 9028.
- 169 Edsall, L.C. et al., 'N, N-Dimethylsphingosine is a potent competitive inhibitor of sphingosine kinase but not of protein kinase C: Modulation of cellular levels of sphingosine 1-phosphate and ceramide.', *Biochemistry*, 37 (1998), 12892–12898.
- 170 Eisen, T. et al. , 'Sorafenib in advanced melanoma: a Phase II randomised discontinuation trial analysis. ', *British Journal Of Cancer*, 95 (2006), 581-586.
- 171 Eklund, L. et al., 'Lack of type XV collagen causes a skeletal myopathy and cardiovascular defects in mice.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (2001), 1194–1199.
- 172 El Ghissassi, F. et al. , 'A review of human carcinogens—part D: radiation. ', *Lancet Oncology*, 10 (2009), 751-752.
- 173 Elder, D., 'Pathology of Melanoma', *Clinical Cancer Research*, 12 (2006), 2308s-2311s.
- 174 Ellerhorst, J.A. , et al., 'Regulation of iNOS by the p44/42 mitogen-activated protein kinase pathway in human melanoma.', *Oncogene*, 25 (2006), 3956-3962.
- 175 Endo, K. et al., 'Cell membrane signaling as target in cancer therapy: Inhibitory effect of N, N-dimethyl and N, N, N-trimethyl sphingosine derivatives on in vitro and in vivo growth of human tumor cells in nude mice.', *Cancer Research*, 51 (1991), 1613.
- 176 English, D. et al., 'Sphingosine 1-phosphate released from platelets during clotting accounts for the potent endothelial cell chemotactic activity of blood serum and provides a novel link between hemostasis and angiogenesis. ', *The FASEB Journal*, 14 (2000), 2255–2265.
- 177 Erdag, G. et al., 'Immunotype and immunohistologic characteristics of tumor-infiltrating immune cells are associated with clinical outcome in metastatic melanoma. ', *Cancer Research*, 72 (2012), 1070–1080.
- 178 Erdmann, F., et al., 'International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008--are recent generations at higher or lower risk?', *International Journal Of Cancer*, 132 (2013), 385-400.
- 179 Erez, N. , et al., 'Cancer-associated fibroblasts are activated in incipient neoplasia to orchestrate tumor-promoting inflammation in an NF-kappa B-dependent manner.', *Cancer Cell*, 17 (2010), 135–147.

- 180 Erhard, H. et al. , 'Transition of horizontal to vertical growth phase melanoma is accompanied by induction of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis.', *Melanoma Research*, 7 (1997), S19-26.
- 181 Erler, J.T. et al., 'Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche.', *Cancer Cell*, 15 (2009), 35–44.
- 182 Espinosa, V., and Rivera, A., 'Cytokines and the regulation of fungus-specific CD4 T cell differentiation.', *Cytokine*, 58 (2012), 100–106.
- 183 Etoh, T., et al., 'Angiogenin expression in human colorectal cancer: The role of focal macrophage infiltration.', *Clinical Cancer Research*, 6 (2000), 3545–3551.
- 184 Eubank, T.D., et al., 'Opposing roles for HIF-1alpha and HIF-2alpha in the regulation of angiogenesis by mononuclear phagocytes.', *Blood*, 117 (2011), 323–332.
- 185 Failli, A. et al., 'Numerical defect of circulating dendritic cell subsets and defective dendritic cell generation from monocytes of patients with advanced melanoma. ', *Cancer Letters*, 337 (2013), 184-192.
- 186 Falchook, G.S. et al. , 'Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: a phase 1 dose-escalation trial.', *Lancet Oncology*, 13 (2012), 782-789.
- 187 Falchook, G.S. et al. , 'Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: a phase 1 dose-escalation trial. ', *Lancet*, 379 (2012), 1893-1901.
- 188 Feige, E., et al., 'Hypoxia-induced transcriptional repression of the melanoma-associated oncogene MITF. ', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (2011), E924-933.
- 189 Feinmesser, M. et al. , 'Relationship of tumorigenic melanigant melanomas to dermal elastin. An expression of tumor/stromal interaction that may be related to prognosis.', *American Journal Of Dermatopathology*, 24 (2002), 108–117.
- 190 Feit, N.E., et al., 'Melanomas detected with the aid of total cutaneous photography. ', *British Journal Of Dermatology*, 150 (2004), 706-714.
- 191 Felding-Habermann, B., 'Integrin adhesion receptors in tumor metastasis.', *Clinical & Experimental Metastasis*, 20 (2003), 203-213.
- 192 Fenouille, N. et al., 'The p53/p21Cip1/ Waf1 pathway mediates the effects of SPARC on melanoma cell cycle progression.', *Pigment Cell Melanoma Research*, 24 (2011), 219-232.
- 193 Ferradini, L. et al. , 'Analysis of T cell receptor variability in tumor-infiltrating lymphocytes from a human regressive melanoma. Evidence for in situ T cell clonal expansion.', *Journal Of Clinical Investigation*, 91 (1993), 1183-1190.
- 194 Ferreras, M., et al., 'Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. ', *FEBS Letters*, 486 (2000), 247–251.
- 195 Fisch, P. , et al., 'Inhibitory MHC class I receptors on gammadelta T cells in tumour immunity and autoimmunity.', *Immunology Today*, 21 (2000), 187-191.

- 196 Fisher, K.E. et al. , 'Tumour cell invasion of collagen matrices requires coordinate lipid agonist-induced G protein and membrane-type matrix metalloproteinase-1-dependent signalling. ', *Journal Of Clinical Oncology*, 5 (2006), 69.
- 197 Flaherty, K. T. et al. , 'Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. ', *New England Journal Of Medicine*, 363 (2010), 809-819.
- 198 Flaherty, K. T. et al. , 'Phase I/II, pharmacokinetic and pharmacodynamic trial of BAY 43–9006 alone in patients with metastatic melanoma. ', *Journal Of Clinical Oncology*, 23 (2005), 3037.
- 199 Flaherty, K.T. , et al., 'From genes to drugs: targeted strategies for melanoma.', *Nature Reviews Cancer*, 12 (2012), 349-361.
- 200 Flaherty, K.T. et al. , 'Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma.', *New England Journal Of Medicine*, 367 (2012), 107-214.
- 201 Forsberg, K. , et al., 'Platelet-derived growth factor (PDGF) in oncogenesis: development of a vascular connective tissue stroma in xenotransplanted human melanoma producing PDGF-BB. ', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (1993), 393-397.
- 202 Francisco, L.M. , et al., 'PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells.', *Journal Of Experimental Medicine*, 206 (2009), 3015-3029.
- 203 Freeman, G. J. et al. , 'Cloning of B7–2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation.', *Science*, 262 (1993), 909-911.
- 204 Freeman, G.J. et al. , 'Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. ', *Journal Of Experimental Medicine*, 192 (2000), 1027-1034.
- 205 French, K. et al., 'Antitumor activity of sphingosine kinase inhibitors.', *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 318 (2006), 596.
- 206 French, K. J. et al., 'Pharmacology and antitumor activity of ABC294640, a selective inhibitor of sphingosine kinase-2.', *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 333 (2010), 129–139.
- 207 French, K.J. et al., 'Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase.', *Cancer Research*, 63 (2003), 5962–5969.
- 208 Fridlender, Z.G. et al. , 'Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN.', *Cancer Cell*, 16 (2009), 183-194.
- 209 Fridman, W.H. et al., 'The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome.', *Nature Reviews Cancer*, 12 (2012), 298–306.
- 210 Fujino, M. et al., 'Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by FTY720 treatment. ', *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 305 (2003), 70–77.
- 211 Fujita, H. et al., 'Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4+ T cells lacking IL-17 production.', *American Journal Of Dermatopathology*, 106 (2009), 21795–21800.

- 212 Fukunaga-Kalabis, M., et al., 'CCN3 controls 3D spatial localization of melanocytes in the human skin through DDR1. ', *Journal Of Cell Biology*, 175 (2006), 563-569.
- 213 Fukunaga-Kalabis, M., et al., 'Tenascin-C promotes melanoma progression by maintaining the ABCB5-positive side population.', *Oncogene*, 29 (2010), 6115-6124.
- 214 Fukunaga-Kalabis, M., et al., 'Downregulation of CCN3 expression as a potential mechanism for melanoma progression. ', *Oncogene*, 27 (2008), 2552-2560.
- 215 Fukunaga-Kalabis, M., et al., 'Matricellular proteins produced by melanocytes and melanomas: In search for functions. ', *Cancer Microenvironment*, 1 (2008), 93-102.
- 216 Gabrilovich, D.I. , et al., 'Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. ', *Nature Reviews Immunology*, 12 (2012), 253-268.
- 217 Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. , 'Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. ', *Nature Reviews Immunology*, 9 (2009), 162-174.
- 218 Gaengel, K., et al., ' Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis.', *Arteriosclerosis Thrombosis And Vascular Biology*, 29 (2009), 630-638.
- 219 Gajewski, T.F. , 'Failure at the effector phase: immune barriers at the level of the melanoma tumor microenvironment. ', *Clinical Cancer Research*, 13 (2007), 5256-5261.
- 220 Gajewski, T.F. , et al., 'Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. ', *Nature Immunology*, 14 (2013), 1014-1022.
- 221 Galluzzi, L. et al. , 'Trial Watch: Adoptive cell transfer immunotherapy.', *Oncoimmunology*, 1 (2012), 306-315.
- 222 Galon, J. et al. , 'Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. ', *Science*, 313 (2006), 1960–1964.
- 223 Gamble, J.R. , and Vadas, M.A. , 'Endothelial adhesiveness for blood neutrophils is inhibited by transforming growth factor-beta.', *Science*, 242 (1988), 97–99.
- 224 Gandini, S., et al., 'Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi', *European Journal of Cancer*, 41 (2005), 28–44.
- 225 Gandini, S., et al., 'Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. ', *European Journal of Cancer*, 41 (2005), 2040-2059.
- 226 Garraway, L. A. et al., 'Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma.', *Nature*, 436 (2005), 117-122.
- 227 Garrido, F. , et al., 'The escape of cancer from T lymphocytes: immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural-irreversible ‘hard’ lesions.', *Cancer Immunology Immunotherapy*, 59 (2010), 1601–1606.
- 228 Gast, A., et al., 'Somatic alterations in the melanoma genome: A high-resolution array-based comparative genomic hybridization study. ', *Genes Chromosomes & Cancer*, 49 (2010), 733–745.

- 229 Geissmann, F. , et al., 'Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells.', *Science*, 327 (2010), 656-661.
- 230 Geller, A.C., et al., 'Melanoma epidemic: an analysis of six decades of data from the Connecticut Tumor Registry.', *Journal Of Clinical Oncology*, 31 (2013), 4172-4178.
- 231 Gerhardt, H., and Semb, H. , 'Pericytes: gatekeepers in tumour cell metastasis? ', *Journal Of Molecular Medicine*, 86 (2008), 135-144.
- 232 Germano, G. et al., 'Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. ', *Cancer Cell*, 23 (2013), 249–262.
- 233 Ghiringhelli, F. et al., 'Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients.', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 56 (2007), 641–648.
- 234 Ghiringhelli, F. et al. , 'Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors.', *Nature Medicine*, 15 (2009), 1170-1178.
- 235 Giancotti, F.G. , and Ruoslati, E., 'Integrin signaling.', *Science*, 285 (1999), 1028-1032.
- 236 Gil-Bernabe, A.M. et al., 'Recruitment of monocytes/macrophages by tissue factor-mediated coagulation is essential for metastatic cell survival and premetastatic niche establishment in mice.', *Blood*, 119 (2012), 3164–3175.
- 237 Gilfillan, S. et al., 'DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors.', *Journal Of Experimental Medicine*, 205 (2008), 2965–2973.
- 238 Girardi, M. et al. , 'Regulation of cutaneous malignancy by gamma delta T cells. ', *Science*, 294 (2001), 605-609.
- 239 Girotti, M.R. et al., 'SPARC promotes cathepsin B-mediated melanoma invasiveness through a collagen I/ α 2 β 1 integrin axis. ', *Journal Of Investigative Dermatology*, 131 (2011), 2438–2447.
- 240 Glass, L.F. , et al., 'Rapid frozen section immunostaining of melanocytes by microphthalmia associated transcription factor. ', *American Journal Of Dermatopathology*, 32 (2010), 319-325.
- 241 Gobert, M. et al., 'Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome.', *Cancer Research*, 69 (2009), 2000–2009.
- 242 Gocheva, V. et al., 'IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion.', *Genes & Development*, 24 (2010), 241–255.
- 243 Goding, C.R. , 'Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage.', *Genes & Development*, 14 (2000), 1712-1728.
- 244 Goetzl, E.J. , and Rosen, H., 'Regulation of immunity by lysosphingolipids and their G protein-coupled receptors.', *Journal Of Clinical Investigation*, 114 (2004), 1531-1537.
- 245 Goni, F.M., et al., 'Biophysics (and sociology) of ceramides.', *Biochemical Society Symposium*, 72 (2005), 177 – 188.

- 246 Goodall, J. , et al., 'The Brn-2 transcription factor links activated BRAF to melanoma proliferation. ', *Molecular And Cellular Biology*, 24 (2004), 2923–2931.
- 247 Gordon, S. , 'Alternative activation of macrophages.', *Nature Reviews Immunology*, 3 (2003), 23–35.
- 248 Gordon, S., and Mantovani, A., 'Diversity and plasticity of mononuclear phagocytes.', *European Journal Of Immunology*, 41 (2011), 2470–2472.
- 249 Gordon, S., and Martinez, F.O., 'Alternative activation of macrophages: mechanism and functions.', *Immunity*, 32 (2010), 593–604.
- 250 Gordon, S., and Taylor, P.R., 'Monocyte and macrophage heterogeneity.', *Nature Reviews Immunology*, 5 (2005), 953–964.
- 251 Gorelik, L. , and Flavell, R.A. , 'Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor- β signaling in T cells.', *Nature Medicine*, 7 (2001), 1118–1122
- 252 Gottardi, C.J. , et al., 'E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner.', *Journal Of Cell Biology*, 153 (2001), 1049-1060.
- 253 Graler, M.H. , and Goetzl, E.J. , 'Lysophospholipids and their G protein-coupled receptors in inflammation and immunity.', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1582 (2002), 168–174.
- 254 Graler, M.H. , and Goetzl, E.J. , 'The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors. ', *FASEB Journal*, 18 (2004), 551–553.
- 255 Graler, M.H. et al., 'The sphingosine 1-phosphate receptor S1P4 regulates cell shape and motility via coupling to Gi and G12/13. ', *Journal of Cellular Biochemistry*, 89 (2003), 507–519.
- 256 Graler, M.H., et al., 'Immunological effects of transgenic constitutive expression of the type 1 sphingosine 1-phosphate receptor by mouse lymphocytes. ', *Journal Of Immunology*, 174 (2005), 1997–2003
- 257 Gray-Schopfer, V., et al., 'Melanoma biology and new targeted therapy', *Nature*, 445 (2007), 851-857.
- 258 Gray-Schopfer, V.C., et al., 'Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16?', *British Journal Of Cancer*, 95 (2006), 496-505.
- 259 Grimshaw, M.J., and Balkwill, F.R. , 'Inhibition of monocyte and macrophage chemotaxis by hypoxia and inflammation—a potential mechanism.', *European Journal Of Immunology*, 31 (2001), 480–489.
- 260 Grimshaw, M.J., et al., 'Endothelin-2 is a macrophage chemoattractant: Implications for macrophage distribution in tumors.', *European Journal Of Immunology*, 32 (2002), 2393–2400.
- 261 Groh, V. , et al., 'Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. ', *Science*, 279 (1998), 1737-1740.
- 262 Groh, V. et al., 'Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. ', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (1996), 12445-12450.

- 263 Groh, V. et al., 'Costimulation of CD8 alpha beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells.', *Nature Immunology*, 2 (2001), 255-260.
- 264 Gu, L. et al., 'Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1.', *Nature*, 404 (2000), 407–411.
- 265 Gude, D.R. et al., 'Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal.', *FASEB Journal*, 22 (2008), 2629-2638.
- 266 Guiducci, C. et al., 'Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection.', *Cancer Research*, 65 (2005), 3437–3446.
- 267 Guldborg, P., et al., 'Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. ', *Cancer Research*, 57 (1997), 3660-3663.
- 268 Guo, J. et al. , 'Phase II, openlabel, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. ', *Journal Of Clinical Oncology*, 29 (2011), 2904-2909.
- 269 Hagemann, T. et al., '—Reeducating” tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB.', *Journal Of Experimental Medicine*, 205 (2008), 1261–1268.
- 270 Hait, N.C., et al., 'Sphingosine kinase type 2 activation by ERK-mediated phosphorylation. ', *Journal Of Biological Chemistry*, 282 (2007), 12058–12065.
- 271 Hait, N.C. et al. , 'Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. ', *Science*, 325 (2009), 1254–1257.
- 272 Hait, N.C. et al. , 'Role of sphingosine kinase 2 in cell migration toward epidermal growth factor.', *Journal Of Biological Chemistry*, 280 (2005), 29462–29469.
- 273 Hait, N.C., et al., 'Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases.', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758 (2006), 2016–2026.
- 274 Halfter, W., et al., 'Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan.', *Journal Of Biological Chemistry*, 273 (1998), 25404–25412.
- 275 Hamid, O. et al., 'Clinical activity, safety, and biomarkers of MPDL3280A, an engineered PD-L1 antibody in patients with locally advanced or metastatic melanoma', *Journal of clinical oncology (Meeting abstracts)*, 9010 (2013).
- 276 Hanahan, D. , and Coussens, L.M. , 'Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. ', *Cancer Cell*, 21 (2012), 309-322.
- 277 Hanahan, D. , and Weinberg, R.A. , 'Hallmarks of cancer: the next generation.', *Cell*, 144 (2011), 646-674.
- 278 Hanahan, D., and Weinberg, R.A. , 'The hallmarks of cancer.', *Cell*, 100 (2000), 57-70.
- 279 Hanel, P., et al., 'Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. The FASEB Journal', 21 (2007), 1202–1209.
- 280 Hanna, B.S., 'Depletion of CLL-associated patrolling monocytes and macrophages controls disease development and repairs immune dysfunction in vivo.', *Leukemia*, In press (2015).

- 281 Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. , 'Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids. ', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9 (2008), 139-150.
- 282 Hao, N.B. et al., 'Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors.', *Clinical and Developmental Immunology*, 2012 (2012), 948098.
- 283 Haq, R. et al. , 'BCL2A1 is a lineage-specific antiapoptotic melanoma oncogene that confers resistance to BRAF inhibition. ', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 110 (2013), 4321-4326.
- 284 Hathcock, K. S. et al. , 'Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation.', *Science*, 262 (1993), 905-907.
- 285 Hauschild, A. et al., 'Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. ', *Lancet*, 380 (2012), 358-365.
- 286 Hauschild, A. et al. , 'Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma.', *Journal Of Clinical Oncology*, 27 (2009), 2823-2830.
- 287 Hauschild, A. et al. , 'An update on overall survival (OS) and follow-on therapies in BREAK-3. ', *Annals Of Oncology*, 25 (2014), iv374-393.
- 288 Hayday, A.C., 'Gamma delta cells : a right time and a right place for a conserved third way of protection. ', *Annual Review Of Immunology*, 18 (2000) , 975-1026.
- 289 Hecht, M.L. et al., 'Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences.', *Journal Of Proteome Research*, 8 (2009), 712–720.
- 290 Heffernan-Stroud, L.A., 'Defining a role for sphingosine kinase 1 in p53-dependent tumors.', *Oncogene*, 31 (2012) , 1166–1175.
- 291 Heidorn, S.J. et al. , 'Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. ', *Cell*, 140 (2010), 209-221.
- 292 Hendi, A. , et al., 'Melanocytes in long-standing sun-exposed skin: quantitative analysis using the MART-1 immunostain. ', *Archives Of Dermatology*, 142 (2006), 871-876.
- 293 Hengst, J. et al., 'Development of a Sphingosine Kinase 1 Specific Small-Molecule Inhibitor.', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20 (2010), 7498–7502.
- 294 Herberman, R. , and Ortaldo, J. , 'Natural killer cells: their role in defense against disease.', *Science*, 214 (1981), 24-29.
- 295 Herbst, R.S. et al., 'Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients.', *Nature*, 515 (2014), 563-567.
- 296 Hersh, E. , et al., 'Phase 3, randomized, open-label, multicenter trial of nab-paclitaxel (nab-P) vs dacarbazine (DTIC) in previously untreated patients with metastatic malignant melanoma (MMM). ', *Pigment Cell & Melanoma Research*, 25 (2012), 836-903.
- 297 Higgins, W., et al., 'Melanoma in situ: histopathology, treatment, and clinical management', *Journal of American Academy of Dermatology*, 73 (2015), 193-203.

- 298 Hirahara, K. et al., 'Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation.', *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21 (2010), 425–434.
- 299 Hiratsuka, S., et al., 'Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis', *Nature Cell Biology*, 8 (2006), 1369–1375.
- 300 Hisano, Y., et al., 'The sphingosine 1-phosphate transporter, SPNS2, functions as a transporter of the phosphorylated form of the immunomodulating agent FTY720. ', *Journal Of Biological Chemistry*, 286 (2011), 1758–1766.
- 301 Hla, T. , 'Signaling and biological actions of sphingosine 1-phosphate.', *Pharmacological Research*, 47 (2003), 401–407.
- 302 Hobson, J.P. et al., 'Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility.', *Science*, 291 (2001), 1800–1803.
- 303 Hodi, F. S. , et al., 'Ipilimumab plus sargramostim versus ipilimumab alone for treatment of metastatic melanoma: a randomized clinical trial. ', *JAMA*, 312 (2014), 1744-1753.
- 304 Hodi, F. S. et al., 'Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma.', *New England Journal Of Medicine*, 25 (2010), 711-723.
- 305 Hodi, F.S. et al. , 'Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin.', *Journal Of Clinical Oncology*, 31 (2013), 3182-3190.
- 306 Hodis, E. et al., 'A landscape of driver mutations in melanoma. ', *Cell*, 150 (2012), 251-263.
- 307 Hofmann-Wellenhof, R. , et al., 'Reflectance confocal microscopy—state-of-art and research overview. ', *Seminars In Cutaneous Medicine And Surgery*, 28 (2009), 172-179.
- 308 Hofmann, L.P. et al. , 'Sphingosine kinase 1 and 2 regulate the capacity of mesangial cells to resist apoptotic stimuli in an opposing manner.', *Biological Chemistry*, 389 (2008), 1399–1407.
- 309 Hofmann, U.B. , et al., 'Matrix metalloproteinases in human melanoma. ', *Journal Of Investigative Dermatology*, 115 (2000), 337-344.
- 310 Hohenester, E., and Engel, J., 'Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins.', *Matrix Biology*, 21 (2002), 115-128.
- 311 Holderfield, M., et al., 'Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond', *Nature Reviews Cancer*, 14 (2014), 455-467.
- 312 Hollenbeak, C.S., et al., 'Increased incidence of melanoma in renal transplantation recipients. ', *Cancer*, 104 (2005), 1962-1967.
- 313 Hölzel, M. , et al., 'Plasticity of tumour and immune cells: a source of heterogeneity and a cause for therapy resistance?', *Nature Reviews Cancer*, 13 (2013), 365-376.
- 314 Hood, J.D. , and Cheresch, D.A. , 'Role of integrins in cell invasion and migration. ', *Nature Reviews Cancer*, 2 (2002), 91-100.
- 315 Houghton, A.M. et al., 'Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema.', *Journal Of Clinical Investigation*, 116 (2006), 753–759.

- 316 Hsu, M.Y. , et al., 'E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors.', *American Journal Of Pathology*, 156 (2000), 1515–1525.
- 317 Hsu, M.Y. et al. , 'Adenoviral gene transfer of $\beta 3$ integrin subunit induces conversion from radial to vertical growth phase in primary human melanoma.', *American Journal Of Pathology*, 153 (1998), 1435-1442.
- 318 Hsu, M.Y., et al., 'Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host.', *Differentiation*, 70 (2002), 522-536.
- 319 Hu, M. , et al., 'Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers.', *Nature Genetics*, 37 (2005), 899-905.
- 320 Huang, M.C., et al., 'Th17 augmentation in OTII TCR plus T cell-selective type 1 sphingosine 1-phosphate receptor double transgenic mice.', *Journal Of Immunology*, 178 (2007), 6806–6813.
- 321 Hudson, B.G., et al., 'Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases.', *Journal Of Biological Chemistry*, 268 (1993), 26033–26036.
- 322 Hughes, J.E. et al. , 'Sphingosine-1-phosphate induces an antiinflammatory phenotype in macrophages.', *Circulation Research*, 102 (2008), 950–958.
- 323 Hume, D.A., 'Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system.', *Mucosal Immunology*, 1 (2008), 432–441.
- 324 Hung, S.P. et al., 'Hypoxia-induced secretion of TGFbeta1 in mesenchymal stem cell promotes breast cancer cell progression.', *Cell Transplantation*, 22 (2013), 1869-1882.
- 325 Huntington, J.T. , et al., 'Overexpression of collagenase 1 (MMP-1) is mediated by the ERK pathway in invasive melanoma cells: role of BRAF mutation and fibroblast growth factor signaling.', *Journal Of Biological Chemistry*, 279 (2004), 33168-33176.
- 326 Hussein, M.R., 'Tumour-associated macrophages and melanoma tumorigenesis: integrating the complexity.', *International Journal Of Experimental Pathology*, 87 (2006), 163-176.
- 327 Huwiler, A. , and Pfeilschifter, J., 'New players on the center stage: sphingosine 1-phosphate and its receptors as drug targets.', *Biochemical Pharmacology*, 75 (2008), 1893-1900.
- 328 Ibrahim, F.B.M., et al., 'Anaphylatoxin signaling in human neutrophils: A key role for sphingosine kinase.', *Journal Of Biological Chemistry*, 279 (2004), 44802–44811.
- 329 Idzko, M. et al. , 'Sphingosine 1-phosphate induces chemotaxis of immature and modulates cytokine release in mature human dendritic cells for emergence of Th2 immune responses. ', *FASEB Journal*, 16 (2002), 625–627.
- 330 Iellem, A. et al., 'Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells.', *Journal Of Experimental Medicine*, 194 (2001), 847–853.
- 331 Igarashi, N., et al., 'Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. ', *Journal Of Biological Chemistry*, 278 (2003), 46832–46839.

- 332 Ikeda, M. et al. , 'Sphingosine-1-phosphate lyase SPL is an endoplasmic reticulum-resident, integral membrane protein with the pyridoxal 50-phosphate binding domain exposed to the cytosol.', *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 325 (2004), 338–343.
- 333 Ilmonen, S., et al., 'Tenascin-C in primary malignant melanoma of the skin. ', *Histopathology*, 45 (2004), 405-411.
- 334 Im, D.S. et al., 'Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8.', *Journal Of Biological Chemistry*, 275 (2000), 14281-14286.
- 335 Imai, Y. et al. , 'Neutrophils enhance invasion activity of human cholangiocellular carcinoma and hepatocellular carcinoma cells: an in vitro study.', *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 20 (2005), 287-293.
- 336 Ino, Y. et al. , 'Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer.', *British Journal Of Cancer*, 108 (2013), 914–923.
- 337 Iozzo, R.V., et al., 'The biology of perlecan: the multifaced heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. ', *Biochemical Journal*, 302 (1994), 625-639.
- 338 Ishida, T. et al., 'Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege.', *Cancer Research*, 66 (2006), 5716–5722.
- 339 Ishii, M. et al., 'Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype.', *Blood*, 114 (2009), 3244–3254.
- 340 Itoh, T. et al. , 'Reduced angiogenesis and tumor regression in gelatinase A deficient mice.', *Cancer Research*, 58 (1998), 1048-1051.
- 341 Itzhaki, O. et al., 'Adoptive T-cell transfer in melanoma.', *Immunotherapy*, 5 (2013), 79-90.
- 342 Ivanov, I. I. et al., 'The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells.', *Cell*, 126 (2006), 1121–1133.
- 343 Ivanov, I.I. et al., 'Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria.', *Cell*, 139 (2009), 485–498.
- 344 Iwakura, Y. et al., 'Functional specialization of interleukin-17 familymembers.', *Immunity*, 34 (2011), 149–162.
- 345 Jensen, T.O. et al., 'Intra-tumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC Stage I/II melanoma.', *Cancer*, 118 (2012), 2476–2485.
- 346 Jensen, T.O. et al., 'Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma. ', *Journal Of Clinical Oncology*, 27 (2009), 3330-3337.
- 347 Jensen, T.O. et al. , 'Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma.', *Cancer*, 118 (2012), 2476-2485.
- 348 Jia, L. , and Wu, C. , 'The biology and functions of Th22 cells.', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 841 (2014), 209–230.

- 349 Jia, L. , and Wu, C. , 'Differentiation, regulation and function of Th9 cells.', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 841 (2014), 181–207.
- 350 Jiang, R. al., 'Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3.', *Hepatology*, 54 (2011), 900–909.
- 351 Jo, E. et al., 'S1P1-selective in vivo-active agonists from high throughput screening: off-the-shelf chemical probes of receptor interactions, signaling, and fate. ', *Chemistry & Biology*, 12 (2005), 703–715.
- 352 Jo, S.K. et al. , 'Divergent roles of sphingosine kinases in kidney ischemia-reperfusion injury.', *Kidney International*, 75 (2009), 167–175.
- 353 Jochems, C. , and Schlom, J., 'Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity.', *Experimental Biology and Medicine*, 236 (2011), 567–579.
- 354 Johann, A.M. et al., 'Apoptotic cell-derived sphingosine-1-phosphate promotes HuR-dependent cyclooxygenase-2 mRNA stabilization and protein expression. ', *Journal Of Immunology*, 180 (2008), 1239–1248.
- 355 Johnson, K.R. et al., 'Role of human sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 in the regulation of intra- and extracellular sphingosine-1-phosphate levels and cell viability. ', *Journal Of Biological Chemistry*, 278 (2003), 34541–34547.
- 356 Jolly, P.S. et al. , 'Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by FcεRI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis.', *Journal Of Experimental Medicine*, 199 (2004), 959–970
- 357 Jones, C.P. et al., 'Activin A and TGF-beta promote T H9 cellmediated pulmonary allergic pathology.', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129 (2012), 1000.e1003–1010.e1003.
- 358 Josefowicz, S.Z., and Rudensky, A. , 'Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance.', *Immunity*, 30 (2009), 616–625.
- 359 Kääriäinen, E., et al., 'Switch to an invasive growth phase in melanoma is associated with tenascin-C, fibronectin, and procollagen-I-forming specific channel structures for invasion.', *Journal Of Pathology*, 210 (2006), 181-191.
- 360 Kamb A, et al. , 'Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus.', *Nature Genetics*, 8 (1994), 23-26.
- 361 Kamijo, T. et al., 'Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF.', *Cell*, 91 (1997), 649-659.
- 362 Kang, K. et al., 'Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity.', *Cell Metabolism*, 7 (2008), 485–495.
- 363 Kao, J. et al., 'Characterization of a novel tumor-derived cytokine. Endothelial-monocyte activating polypeptide II.', *Journal Of Biological Chemistry*, 269 (1994), 25106–25119.
- 364 Kaplan, M.H., et al., 'The development and in vivo function of T helper 9 cells.', *Nature Reviews Immunology*, 15 (2015), 295–307.

- 365 Kappos, L. et al., 'Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. ', *New England Journal Of Medicine*, 355 (2006), 1124–1140.
- 366 Karre, K. , 'Natural killer cell recognition of missing self. ', *Nature Immunology*, 9 (2008), 477-480.
- 367 Kawakami, Y. , et al., 'Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. ', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 91 (1994), 3515-3519.
- 368 Kawamori, T. et al., 'Role for sphingosine kinase 1 in colon carcinogenesis', *FASEB Journal*, 23 (2009), 405–414.
- 369 Kawamori, T. et al. , 'Sphingosine kinase 1 is up-regulated in colon carcinogenesis.', *The FASEB Journal*, 20 (2006), 386–388.
- 370 Kawanabe, T. , et al., 'Sphingosine 1-phosphate accelerates wound healing in diabetic mice. ', *Journal Of Dermatological Science*, 48 (2007), 53–60.
- 371 Keir, M.E. , et al., 'Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. ', *Journal Of Experimental Medicine*, 203 (2006), 883-895.
- 372 Kershaw, M.H. , et al., 'Gene engineered T cells for cancer therapy. ', *Nature Reviews Cancer*, 13 (2013), 525-541.
- 373 Kessenbrock, K. , et al., 'Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment.', *Cell*, 141 (2010), 52-67.
- 374 Kharel, Y. et al. , 'Sphingosine kinase 2 is required for modulation of lymphocyte traffic by FTY720. ', *Journal Of Biological Chemistry*, 280 (2005), 36865–36872.
- 375 Kim, K.B. et al. , 'Phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor trametinib in patients with metastatic BRAF-mutant cutaneous melanoma previously treated with or without a BRAF inhibitor. ', *Journal Of Clinical Oncology*, 31 (2013), 482-489.
- 376 Kim, Y.M. et al. , 'Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinases. ', *Cancer Research*, 60 (2000), 5410–5413.
- 377 Kimyai-Asadi, A. , et al., 'The 20-minute rapid MART-1 immunostain for malignant melanoma frozen sections. ', *Dermatologic Surgery*, 34 (2008), 498-500.
- 378 King, A. J. et al. , 'Demonstration of a genetic therapeutic index for tumors expressing oncogenic BRAF by the kinase inhibitor SB-590885. ', *Cancer Research*, 66 (2006), 11100–11105.
- 379 Klarquist, J.S. , and Janssen, E.M., 'Melanoma-infiltrating dendritic cells. Limitations and opportunities of mouse models.', *Oncoimmunology*, 9 (2012), 1584-1593.
- 380 Klein, E.A., and Assoian, R.K. , 'Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance.', *Journal Of Cell Science*, 121 (2008), 3853-3857.
- 381 Klemm, F. , and Joyce, J.A. , 'Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer', *Trends in Cell Biology*, 25 (2015), 198-213.

- 382 Kluk, M.J., and Hla, T., 'Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1582 (2002), 72– 80.
- 383 Knaapen, A.M. et al., 'Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review.', *Mutagenesis*, 21 (2006), 225-236.
- 384 Kobayashi, N. et al. , 'Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization.', *Cancer Research*, 70 (2010), 7073–7083.
- 385 Kobayashi, N., et al., 'Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner.', *Journal of Lipid Research*, 47 (2006), 614-621.
- 386 Kobold, S. et al., 'Interleukin-22 is frequently expressed in small- and large-cell lung cancer and promotes growth in chemotherapy-resistant cancer cells.', *Journal of Thoracic Oncology*, 8 (2013), 1032–1042.
- 387 Kodumudi, K.N., et al., 'Blockade of myeloid-derived suppressor cells after induction of lymphopenia improves adoptive T cell therapy in a murine model of melanoma. ', *Journal Of Immunology*, 189 (2012), 5147-5154.
- 388 Kolter, T., et al., 'Combinatorial ganglioside biosynthesis. ', *Journal Of Biological Chemistry*, 277 (2002), 25859 – 25862.
- 389 Komohara, Y. , et al., 'Tumor-associated macrophages: Potential therapeutic targets for anti-cancer therapy', *Advanced Drug Delivery Reviews* (2015), In Press.
- 390 Komohara, Y. et al., 'The coordinated actions of TIM-3 on cancer and myeloid cells in the regulation of tumorigenicity and clinical prognosis in clear cell renal cell carcinomas.', *Cancer Immunology Research*, 3 (2015), 999–1007.
- 391 Kon, J. et al., 'Comparison of intrinsic activities of the putative sphingosine 1-phosphate receptor subtypes to regulate several signaling pathways in their cDNA-transfected Chinese hamster ovary cells.', *Journal Of Biological Chemistry*, 274 (1999) , 23940-23947.
- 392 Kono, K., et al., 'Inhibition of recombinant sphingosine kinases by novel inhibitors of microbial origin, F-12509A and B-5354c.', *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 55 (2002), 99–103.
- 393 Kono, Y. et al., 'Sphingosine kinase 1 regulates differentiation of human and mouse lung fibroblasts mediated by TGF-beta1. ', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 37 (2007), 395–404.
- 394 Korn, T., et al., 'IL-17 and Th17 cells.', *Annual Review Of Immunology*, 27 (2009), 485–517.
- 395 Koukourakis, M.I. , 'Different patterns of stromal and cancer cell thymidine phosphorylase reactivity in non-small-cell lung cancer: impact on tumour neoangiogenesis and survival.', *British Journal Of Cancer*, 77 (1998), 1696–1703.
- 396 Kraehn, G.M., et al., 'Extra c-myc oncogene copies in high risk cutaneous malignant melanoma and melanoma metastases.', *British Journal Of Cancer*, 84 (2001), 72-79.
- 397 Krausgruber, T. et al., 'IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses.', *Nature Immunology*, 12 (2011), 231–238.

- 398 Kryczek, I. et al. , 'B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma.', *Journal Of Experimental Medicine*, 203 (2006), 871–881.
- 399 Kuang, D.M. et al., 'Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1.', *Journal Of Experimental Medicine*, 206 (2009), 1327–1337.
- 400 Kubota, Y. et al., 'MCSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis.', *Journal Of Experimental Medicine*, 206 (2009), 1089–1102.
- 401 Kujawski, M. et al., 'Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice', *Journal Of Clinical Investigation*, 118 (2008), 3367–3377.
- 402 Kulkarni, A.B. et al., 'Transforming growth factor β 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. ', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (1993), 770–774
- 403 Kumar, S., et al., 'Functional characterization of stromal osteopontin in melanoma progression and metastasis.', *PLOS ONE*, 8 (2013), 1-12.
- 404 Kunkel, G.T. et al. , 'Targeting the sphingosine-1-phosphate axis in cancer, inflammation and beyond. ', *Nature Reviews Drug Discovery*, 12 (2013), 688-702.
- 405 Kupper, T.S. , and Fuhlbrigge, R.C. , 'Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences.', *Nature Reviews Immunology*, 4 (2004), 211-222.
- 406 Kuratomi, Y. et al. , 'Laminin γ 1 chain peptide, C-16 (KAFDITYVRLKF), promotes migration, MMP-9 secretion, and pulmonary metastasis of B16-F10 mouse melanoma cells. ', *British Journal Of Cancer*, 86 (2002), 1169-1173.
- 407 Labrousse, A.L., et al., 'Stromal reaction in cutaneous melanoma', *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 49 (2004), 269–275.
- 408 Lahiri, S. , and Futerman, A.H., 'The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids.', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64 (2007), 2270-2284.
- 409 Lai, W.Q. et al. , 'Distinct roles of sphingosine kinase 1 and 2 in murine collagen-induced arthritis. ', *Journal Of Immunology*, 183 (2009), 2097–2103.
- 410 Lakshmikanth, T. et al., 'NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. ', *Journal Of Clinical Investigation*, 119 (2009), 1251–1263.
- 411 LaMontagne, K. et al. , 'Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization.', *Cancer Research*, 66 (2006), 221-231.
- 412 Lan, Y.Y. et al. , 'The sphingosine-1-phosphate receptor agonist FTY720 modulates dendritic cell trafficking in vivo. ', *American Journal Of Transplantation*, 5 (2005), 2649–2659.
- 413 Lança, T., and Silva-Santos, B. , 'The split nature of tumorinfiltrating leukocytes: implications for cancer surveillance and immunotherapy.', *Oncoimmunology*, 1 (2012), 717–725.
- 414 Landsberg, J. et al., 'Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation.', *Nature*, 490 (2012), 412-416.

- 415 Lang, R. et al., 'Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10.', *Journal Of Immunology*, 169 (2002), 2253–2263.
- 416 Langrish, C.L. et al., 'IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation.', *Journal Of Experimental Medicine*, 201 (2005), 233–240.
- 417 Lanier, L.L., 'NK cell recognition. ', *Annual Review Of Immunology*, 23 (2005), 225-274.
- 418 Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. , 'Regulation of T cell immunity by dendritic cells. ', *Cell*, 106 (2001), 263-266.
- 419 Laoui, D., 'Functional Relationship between Tumor-Associated Macrophages and Macrophage Colony-Stimulating Factor as Contributors to Cancer Progression.', *Frontiers in Immunology*, 5 (2014).
- 420 Laoui, D. et al., 'Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population.', *Cancer Research*, 74 (2014), 24–30.
- 421 Larkin, J. et al. , 'Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma.', *New England Journal Of Medicine*, 372 (2015), 2006-2017.
- 422 Larue, L., and Delmas, V. , 'The WNT/beta-catenin pathway in melanoma. ', *Frontiers in Bioscience*, 11 (2006), 733-742.
- 423 Lauder, I. , and Aherne, W. , 'The significance of lymphocytic infiltration in neuroblastoma.', *British Journal Of Cancer*, 26 (1972), 321–330.
- 424 Lawrence, M.S. et al., 'Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes.', *Nature*, 499 (2013), 214-218.
- 425 Lawrence, T., and Gilroy, D.W., 'Chronic inflammation: a failure of resolution?', *International Journal Of Experimental Pathology*, 88 (2007), 85–94.
- 426 Lazar-Molnar, E. , et al., 'Autocrine and paracrine regulation of cytokines and growth factors in melanoma.', *Cytokine*, 12 (2000), 547-554.
- 427 Le Stunff, H. , et al., 'Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis. ', *Journal Of Cell Biology*, 158 (2002), 1039–1049.
- 428 Le Stunff, H. et al. , 'Characterization of murine sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase. ', *Journal Of Biological Chemistry*, 277 (2002), 8920–8927.
- 429 Leach, D.R., et al., 'Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade.', *Science*, 271 (1996), 1734-1736.
- 430 Ledda, F. , et al., 'The expression of the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma. ', *Journal Of Investigative Dermatology*, 108 (1997), 210-214.
- 431 Lee, H. et al. , 'Stat3-induced S1PR1 expression is critical for persistent Stat3 activation in tumors.', *Nature Medicine*, 16 (2010), 1421–1428.

- 432 Lee, J.H. , et al., 'Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: A meta-analysis.', *British Journal Of Dermatology*, 164 (2011), 776–784.
- 433 Lee, J.T., and Herlyn, M., 'Microenvironmental influences in melanoma progression', *Journal of Cellular Biochemistry*, 101 (2007), 862–872.
- 434 Lee, M.J. et al., 'Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate.', *Cell*, 99 (1999), 301-312.
- 435 Lee, M.J., et al., 'The inducible G protein-coupled receptor edg-1 signals via the G(i)/mitogen-activated protein kinase pathway.', *Journal Of Biological Chemistry*, 271 (1996), 11272-11279.
- 436 Lee, M.J., et al., 'Lysophosphatidic acid stimulates the G-protein-coupled receptor EDG-1 as a low affinity agonist.', *Journal Of Biological Chemistry*, 273 (1998), 22105-22112.
- 437 Leek, R.D. , et al., 'Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma', *Cancer Research*, 56 (1996), 4625-4629.
- 438 Lenschow, D.J. , et al., 'CD28/B7 system of T cell costimulation.', *Annual Review Of Immunology*, 14 (1996), 233-258.
- 439 Lepine, S. et al., 'Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase-1 regulates ER stress-induced autophagy. ', *Cell Death And Differentiation*, 18 (2011), 350-361.
- 440 Leroux, M.E. et al., 'Sphingolipids and the sphingosine kinase inhibitor, SKI II, induce BCL-2-independent apoptosis in human prostatic adenocarcinoma cells.', *The Prostate*, 67 (2007), 1699–1717.
- 441 Levy, C., et al., 'MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. ', *Trends In Molecular Medicine*, 12 (2006), 406–414
- 442 Lewis, C.E., and Pollard, J.W., 'Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments.', *Cancer Research*, 66 (2006), 605–612.
- 443 Lewis, J.S., et al., 'Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas.', *Journal Of Pathology*, 192 (2000), 150–158.
- 444 Ley, K. , and Morris, M. , 'Signals for lymphocyte egress. ', *Nature Immunology*, 6 (2005), 1215–1216.
- 445 Li, D., et al., 'Basement membrane zone type XV collagen is a disulfide-bonded chondroitin-sulfate proteoglycan in human tissues and cultured cells. ', *Journal Of Biological Chemistry*, 275 (2000), 22339–22347.
- 446 Li, G. , et al., 'N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells.', *Cancer Research*, 61 (2001), 3819-3825.
- 447 Li, M.O., and Flavell, R.A., 'TGF-beta: a master of all T cell trades.', *Cell*, 134 (2008), 392–404.
- 448 Liang, J. et al. , ' Sphingosine-1-phosphate links persistent STAT3 activation, chronic intestinal inflammation, and development of colitis associated cancer.', *Cancer Cell*, 23 (2013), 107-120.

- 449 Liao, J.J., et al., 'Cutting Edge: Alternative signaling of Th17 cell development by sphingosine 1-phosphate.', *Journal Of Immunology*, 178 (2007), 5425–5428.
- 450 Liao, X. et al., 'Kruppel-like factor 4 regulates macrophage polarization.', *Journal Of Clinical Investigation*, 121 (2011), 2736–2749.
- 451 Licht, T. et al., 'Induction of pro-angiogenic signaling by a synthetic peptide derived from the second intracellular loop of S1P3 (EDG3).', *Blood*, 102 (2003), 2099–2107.
- 452 Lieberman, J., 'The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal.', *Nature Reviews Immunology*, 3 (2003), 361–370.
- 453 Lien, Y.H., et al., 'S1P1-selective agonist, SEW2871, ameliorates ischemic acute renal failure.', *Kidney International*, 69 (2006), 1601–1608.
- 454 Lim, K.G. et al., 'FTY720 analogues as sphingosine kinase 1 inhibitors: enzyme inhibition kinetics, allosterism, proteasomal degradation, and actin rearrangement in MCF-7 breast cancer cells.', *Journal Of Biological Chemistry*, 286 (2011), 18633–18640.
- 455 Lin, E.Y., et al., 'Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy.', *Journal Of Experimental Medicine*, 193 (2001), 727–740.
- 456 Lin, W. et al., 'Hepatitis C virus regulates transforming growth factor beta1 production through the generation of reactive oxygen species in a nuclear factor kappaB-dependent manner.', *Gastroenterology*, 138 (2010), 2509-2518.
- 457 Ling, E.M. et al., 'Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease.', *Lancet*, 363 (2004), 608–615.
- 458 Linsley, P. S. et al., 'Human B7–1 (CD80) and B7–2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors.', *Immunity*, 1 (1994), 793-801.
- 459 Lissbrant, I.F., et al., 'Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival', *International journal Of Oncology*, 17 (2000), 445–451.
- 460 Lito, P., et al., 'Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors.', *Nature Medicine*, 19 (2013), 1401-1409.
- 461 Liu, F. et al., 'Differential regulation of sphingosine-1-phosphate- and VEGF-induced endothelial cell chemotaxis. Involvement of G(alpha2)-linked Rho kinase activity.', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 24 (2001), 711–719.
- 462 Liu, H. et al., 'Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform.', *Journal Of Biological Chemistry*, 275 (2000), 19513–19520.
- 463 Liu, X., et al., 'Regulation of metabolism and transport of sphingosine-1-phosphate in mammalian cells.', *Molecular And Cellular Biochemistry*, 363 (2012), 21-33.
- 464 Liu, Y. et al., 'Unique expression of suppressor of cytokine signaling 3 is essential for classical macrophage activation in rodents in vitro and in vivo.', *Journal Of Immunology*, 180 (2008), 6270–6278.

- 465 Lo, J.A., and Fisher, D.E., 'The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics.', *Science*, 346 (2014), 945-949.
- 466 Locksley, R.M. , et al., 'The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology.', *Cell*, 104 (2001), 487–501.
- 467 Long, E.O. , 'Ready for prime time: NK cell priming by dendritic cells. ', *Immunity*, 26 (2007), 385-387.
- 468 Long, G.V. et al., 'Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. ', *Journal Of Clinical Oncology*, 29 (2011), 1239-1246.
- 469 Lu, C. et al. , 'The genomic landscape of childhood and adolescent melanoma.', *Journal Of Investigative Dermatology*, 135 (2014), 816-823.
- 470 Lund, F.E. , and Randall, T.D., 'Effector and regulatory B cells: Modulators of CD4+ T cell immunity. ', *Nature Reviews Immunology*, 10 (2010), 236–247.
- 471 Maccalli, C. et al., 'NKG2Dmediated antitumor activity by tumor-infiltrating lymphocytes and antigen-specific Tcell clones isolated from melanoma patients.', *Clinical Cancer Research*, 13 (2007), 7459–7468.
- 472 Maceyka, M., et al., 'Filamin A links sphingosine kinase 1 and sphingosine-1-phosphate receptor 1 at lamellipodia to orchestrate cell migration. ', *Molecular And Cellular Biology*, 28 (2008), 5687–5697.
- 473 Maceyka, M. et al. , 'SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism.', *Journal Of Biological Chemistry*, 280 (2005), 37118–37129.
- 474 Maceyka, M., et al., 'Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. ', *Trends in Cell Biology*, 22 (2012), 50-60.
- 475 Maceyka, M. , and Spiegel, S., 'Sphingolipid metabolites in inflammatory disease.', *Nature*, 510 (2014), 58–67.
- 476 Mackensen, A. et al., 'Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells.', *International Journal Of Cancer*, 86 (2000), 385-392.
- 477 MacKinnon, A.C. , et al., 'Sphingosine kinase: a point of convergence in the action of diverse neutrophil priming agents.', *Journal Of Immunology*, 169 (2002), 6394-6400.
- 478 MacKinnon, A.C. et al., 'Sphingosine kinase: A point of convergence in the action of diverse neutrophil priming agents.', *Journal Of Immunology*, 169 (2002), 6394–6400.
- 479 Maeda, Y. et al. , 'Migration of CD4 T cells and dendritic cells toward sphingosine 1-phosphate (S1P) is mediated by different receptor subtypes: S1P regulates the functions of murine mature dendritic cells via S1P receptor type 3.', *Journal Of Immunology*, 178 (2007), 3437–3446.
- 480 Mahabeleshwar, G.H. , and Byzova, T.V., 'Angiogenesis in melanoma.', *Seminars in Oncology*, 34 (2007), 555-565.
- 481 Mahabeleshwar, G.H. et al., 'The myeloid transcription factor KLF2 regulates the host response to polymicrobial infection and endotoxic shock.', *Immunity*, 34 (2011), 715–728.

- 482 Malchinkhuu, E. et al. , 'S1P2 receptors mediate inhibition of glioma cell migration through Rho signalling pathways independent of PTEN.', *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 366 (2008), 963–968
- 483 Malek, R.L. et al., 'Nrg-1 belongs to the endothelial differentiation gene family of G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors.', *Journal Of Biological Chemistry*, 276 (2001), 5692-5699.
- 484 Malumbres, M., and Barbacid, M. , 'Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm.', *Nature Reviews Cancer*, 9 (2009), 153-166.
- 485 Malyshev, I., and Malyshev, Y., 'Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage "Switch" Phenotype.', *Biomed Research International*, 2015 (2015), 341308.
- 486 Mandala, S. et al. , 'Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists.', *Science*, 296 (2002), 346–349.
- 487 Mandala, S. M. et al. , 'Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (2000), 7859–7864.
- 488 Mandala, S. M. et al. , 'Sphingoid base 1-phosphate phosphatase: a key regulator of sphingolipid metabolism and stress response.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (1998), 150–155.
- 489 Mangan, P.R. et al. , 'Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. ', *Nature*, 441 (2006), 231–234
- 490 Manning, A.L., and Dyson, N.J. , 'RB: Mitotic implications of a tumour suppressor. ', *Nature Reviews Cancer*, 12 (2012), 220-226.
- 491 Mantovani, A., 'B cells and macrophages in cancer: yin and yang', *Nature Medicine*, 17 (2011), 285–286.
- 492 Mantovani, A. , et al., 'Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling.', *Journal Of Pathology*, 229 (2013), 176-185.
- 493 Mantovani, A. , and Locati, M., 'Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions.', *Arteriosclerosis Thrombosis And Vascular Biology*, 33 (2013), 1478-1483.
- 494 Mantovani, A. et al., 'The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization.', *Trends In Immunology*, 25 (2004), 677-686.
- 495 Mantovani, A. et al. , 'Macrophage polarization: tumor associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes.', *Trends In Immunology*, 23 (2002), 549-555.
- 496 Mao, C., et al., 'The dihydrosphingosine-1-phosphate phosphatases of *Saccharomyces cerevisiae* are important regulators of cell proliferation and heat stress responses. ', *Biochemical Journal*, 342 (1999), 667–675.

- 497 Mao, C., et al., 'Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* dihydrosphingosine-1-phosphate phosphatase.', *Journal Of Biological Chemistry*, 272 (1997), 28690–28694
- 498 Markel, G. et al., 'Natural killer lysis receptor (NKLRL)/NKLRLligand matching as a novel approach for enhancing anti-tumor activity of allogeneic NK cells.', *PLOS ONE*, 4 (2009), e5597.
- 499 Marneros, A.G., and Olsen, B.R., 'The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis.', *Matrix Biology*, 20 (2001), 337–345.
- 500 Marsh, J.L. et al., 'Embelin suppresses pancreatic cancer growth by modulating tumor immune microenvironment.', *Frontiers in Bioscience*, 19 (2014), 113–125.
- 501 Martin-Fontecha, A. et al. , 'Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming.', *Nature Immunology*, 5 (2004), 1260-1265.
- 502 Martin, M.D., and Matrisian, L.M., 'The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. ', *Cancer and Metastasis Reviews*, 26 (2007), 717-724.
- 503 Martinez-Nunez, R.T., et al., 'The interleukin 13 (IL-13) pathway in human macrophages is modulated by microRNA-155 via direct targeting of interleukin 13 receptor alpha (IL13Ralpha1).', *Journal Of Biological Chemistry*, 286 (2011), 1786–1794.
- 504 Martinez, F.O., et al., 'Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective.', *Annual Review Of Immunology*, 27 (2009), 451–483.
- 505 Maruyama, T. et al., 'Control of the differentiation of regulatory T cells and TH17 cells by the DNA-binding inhibitor Id3.', *Nature Immunology*, 12 (2011), 86-95
- 506 Maruyama, T. et al., 'Distribution of Th17 cells and FoxP3(+) regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes, tumor-draining lymph nodes and peripheral blood lymphocytes in patients with gastric cancer.', *Cancer Science*, 101 (2010), 1947–1954.
- 507 Massague, J. , et al., 'TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. ', *Cell*, 103 (2000), 295–309.
- 508 Matloubian, M. et al., 'Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. ', *Nature*, 427 (2004), 355–360.
- 509 Matschurat, S. et al., 'Regulation of EMAP II by hypoxia.', *American Journal Of Pathology*, 162 (2003), 93–103.
- 510 Mayer, J.E., et al., 'Screening, early detection, education, and trends for melanoma: current status (2007-2013) and future directions: Part I. Epidemiology, high-risk groups, clinical strategies, and diagnostic technology.', *Journal Of The American Academy Of Dermatology*, 71 (2014), 599-609.
- 511 McArthur, G.A. et al., 'Safety and efficacy of vemurafenib in BRAFV600E and BRAFV600K mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, openlabel study. ', *Lancet Oncology*, 15 (2014), 323-332.
- 512 McPherson, M. et al. , 'Presentation and detection of invasive melanoma in a high-risk population.', *Journal of American Academy of Dermatology*, 54 (2006), 783-792.

- 513 Mechtcheriakova, D. et al., 'Sphingosine 1-phosphate phosphatase 2 is induced during inflammatory responses.', *Cellular Signalling*, 19 (2007), 748-760.
- 514 Melchiori, A. et al. , 'The $\alpha 3\beta 1$ integrin is involved in melanoma migration and invasion.', *Experimental Cell Research*, 219 (1995), 233-242.
- 515 Melero, I., et al., 'Evolving synergistic combinations of targeted immunotherapies to combat cancer.', *Nature Reviews Cancer*, 15 (2015), 457-472.
- 516 Mellman, I. , et al., 'Cancer immunotherapy comes of age.', *Nature*, 480 (2011), 480-489.
- 517 Menaldino, D.S. et al., 'Sphingoid bases and de novo ceramide synthesis: enzymes involved, pharmacology and mechanisms of action. ', *Pharmacological Research*, 47 (2003), 373 – 381.
- 518 Mendez, R. et al., 'HLA and melanoma: multiple alterations in HLA class I and II expression in human melanoma cell lines from ESTDAB cell bank. ', *Cancer Immunology Immunotherapy*, 58 (2009), 1507–1515.
- 519 Menetrier-Caux, C. et al. , 'Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34+ progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor.', *Blood*, 92 (1998), 4778-4791.
- 520 Menzies, S.W. , and Zalaudek, I. , 'Why perform dermoscopy? The evidence for its role in the routine management of pigmented skin lesions.', *Archives Of Dermatology*, 142 (2006), 1211-1212.
- 521 Merrill, A.H. et al., 'Sphingolipids—The enigmatic lipid class: Biochemistry, physiology, and pathophysiology.', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 142 (1997), 208–225.
- 522 Metelitsa, L.S., et al., 'Expression of CD1d by myelomonocytic leukemias provides a target for cytotoxic NKT cells.', *Leukemia*, 17 (2003), 1068–1077.
- 523 Michielin, O., and Hoeller, C., 'Gaining momentum: New options and opportunities for the treatment of advanced melanoma.', *Cancer Treatment Reviews*, 41 (2015), 660-670.
- 524 Middleton, M.R., et al., 'Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. ', *Journal Of Clinical Oncology*, 18 (2000), 158-166.
- 525 Miller, A., and Mihm, M., 'Melanoma', *The New England Journal Of Medicine*, 355 (2006), 51-65.
- 526 Miller, A.V. , et al., 'Sphingosine kinases and sphingosine- 1-phosphate are critical for transforming growth factor beta-induced extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation and promotion of migration and invasion of esophageal cancer cells.', *Molecular And Cellular Biology*, 28 (2008), 4142-4151.
- 527 Milliken, D. , et al., 'Analysis of chemokines and chemokine receptor expression in ovarian cancer ascites.', *Clinical Cancer Research*, 8 (2002), 1108–1114.
- 528 Min, J. et al. , 'Sphingosine-1-phosphate lyase regulates sensitivity of human cells to select chemotherapy drugs in a p38-dependent manner. ', *Molecular Cancer Research*, 3 (2005), 287–296.

- 529 Mitchell, D.A. , and Nair, S.K. , 'RNA-transfected dendritic cells in cancer immunotherapy.', *Journal Of Clinical Investigation*, 106 (2000), 1065-1069.
- 530 Mitchem, J.B. et al., 'Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses.', *Cancer Research*, 73 (2013), 1128–1141.
- 531 Mitra, P. et al. , 'Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. ', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (2006), 16394–16399.
- 532 Mitra, P., et al., 'Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (2006), 16394–16399.
- 533 Mizugishi, K., et al., 'Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. ', *Molecular And Cellular Biology*, 25 (2005), 11113–11121.
- 534 Mizukami, Y. et al., 'CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+regulatory T cells in gastric cancer.', *International Journal Of Cancer*, 122 (2008), 2286–2293.
- 535 Mizutani, K. et al., 'The chemokine CCL2 increases prostate tumor growth and bone metastasis through macrophage and osteoclast recruitment. ', *Neoplasia*, 11 (2009), 1235–1242.
- 536 Mocellin, S. , and Nitti, D., 'Cutaneous melanoma in situ: translational evidence from a large population-based study. ', *Oncologist*, 16 (2011), 896-903.
- 537 Mocikat, R. et al. , 'Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8T cell responses.', *Immunity*, 19 (2003), 561-569.
- 538 Molkenin, J.D. , 'The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6.', *Journal Of Biological Chemistry*, 275 (2000), 38949–38952.
- 539 Moore, K.W. et al., 'Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. ', *Annual Review Of Immunology*, 19 (2001), 683-765.
- 540 Moreno, B.H., and Ribas, A., 'Anti-programmed cell death protein-1/ligand-1 therapy in different cancers', *British Journal Of Cancer*, 112 (2015), 1421–1427.
- 541 Moretta, A. , et al., 'Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity.', *Annual Review Of Immunology*, 19 (2001), 197-223.
- 542 Moretta, L. et al., 'Human NK-cell receptors.', *Immunology Today*, 21 (2000), 420–422.
- 543 Morris, J.C. et al., 'Phase I study of GC1008 (fresolimumab): a human anti-transforming growth factor-beta (TGFbeta) monoclonal antibody in patients with advanced malignant melanoma or renal cell carcinoma.', *PLOS ONE*, 9 (2014), e90353.
- 544 Mosser, D.M., and Edwards, J.P., 'Exploring the full spectrum of macrophage activation.', *Nature Reviews Immunology*, 8 (2008), 958–969.
- 545 Mougiakakos, D. et al., 'Regulatory T cells in cancer.', *Advances in Cancer Research*, 107 (2010), 57–117.

- 546 Movahedi, K. et al., 'Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. ', *Cancer Research*, 70 (2010), 5728–5739.
- 547 Mullen, A.C. et al., 'Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection.', *Science*, 292 (2001), 1907–1910.
- 548 Mullen, T.D., et al., 'Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. ', *Biochemical Journal*, 441 (2012), 789-802.
- 549 Muller, H. et al. , 'The immunomodulator FTY720 interferes with effector functions of human monocyte derived dendritic cells.', *European Journal Of Immunology*, 35 (2005), 533–545.
- 550 Murdoch, C. et al., 'The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis.', *Nature Reviews Cancer*, 8 (2008), 618–631.
- 551 Murdoch, C., et al., 'Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues.', *Blood*, 104 (2004), 2224–2234.
- 552 Murdoch, C., and Lewis, C.E., 'Macrophage migration and gene expression in response to tumor hypoxia. ', *Integrative Cancer Therapies*, 117 (2005), 701–708.
- 553 Murdoch, C., et al., 'Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2.', *Journal Of Immunology*, 178 (2007), 7405–7411.
- 554 Murphy, K.M., and Stockinger, B., 'Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances', *Nature Immunology*, 11 (2010), 674–680.
- 555 Murray, P.J. , and Wynn, T.A., 'Protective and pathogenic functions of macrophage subsets.', *Nature Reviews Immunology*, 11 (2011), 723-737.
- 556 Myers, J.C. et al., 'Biochemical and immunohistochemical characterization of human type XIX collagen defines a novel class of basement membrane zone collagens.', *American Journal Of Pathology*, 151 (1997), 1729–1740.
- 557 Nagai, T. et al., 'Targeting tumor-associated macrophages in an experimental glioma model with a recombinant immunotoxin to folate receptor beta.', *Cancer Immunology Immunotherapy*, 58 (2009), 1577–1586.
- 558 Nagy, J.A., et al., 'Heterogeneity of the tumor vasculature. ', *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 36 (2010), 321-331.
- 559 Nakano, O. et al. , 'Proliferative activity of intratumoral CD8+ T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma clinicopathologic demonstration of antitumor immunity.', *Cancer Research*, 61 (2001), 5132–5136.
- 560 Nakao, S. et al. , 'Infiltration of COX-2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 beta-induced neovascularization and tumor growth.', *Journal Of Clinical Investigation*, 115 (2005), 2979–2991.
- 561 Nathan, C., 'Points of control in inflammation.', *Nature*, 420 (2002), 846-852.
- 562 'National Cancer Institute web site. Late effects of treatment for childhood cancer.', (2014).

- 563 Nava, V.E. et al., 'Sphingosine kinase type 1 promotes estrogen-dependent tumorigenesis of breast cancer MCF-7 cells.', *Experimental Cell Research*, 281 (2002), 115–127.
- 564 Negus, R.P. et al., 'The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer. ', *Journal Of Clinical Investigation*, 95 (1995), 2391–2396.
- 565 Nestle, F.O., et al., 'Skin immune sentinels in health and disease', *Nature Reviews Immunology*, 9 (2009), 679-691
- 566 Nestle, F.O. et al., 'Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells.', *Nature Medicine*, 4 (1998), 328-332.
- 567 Niessen, F. et al. , 'Dendritic cell PAR1–S1P3 signalling couples coagulation and inflammation. ', *Nature*, 452 (2008), 654–658.
- 568 Nikiteas, N.I. et al. , 'Serum IL-6, TNFalpha and CRP levels in Greek colorectal cancer patients: prognostic implications.', *World Journal of Gastroenterology*, 11 (2005), 1639-1643.
- 569 Nikkola, J. , et al., 'High expression levels of collagenase-1 and stromelysin-1 correlate with shorter disease-free survival in human metastatic melanoma.', *International Journal Of Cancer*, 97 (2002), 432-438.
- 570 Niwa, M. , et al., 'Tumor necrosis factor-alpha-mediated signal transduction in human neutrophils: Involvement of sphingomyelin metabolites in the priming effect of TNF-alpha on the fMLP-stimulated superoxide production.', *Life Sciences*, 66 (2000), 245-256.
- 571 Nofer, J.R. et al. , 'FTY720, a synthetic sphingosine 1 phosphate analogue, inhibits development of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptordeficient mice. ', *Circulation*, 115 (2007), 501–508.
- 572 Novgorodov, A.S. et al., 'Activation of sphingosine-1-phosphate receptor S1P5 inhibits oligodendrocyte progenitor migration.', *The FASEB Journal*, 21 (2007), 1503–1514.
- 573 Ntayi, C. et al., 'Contact with elastin-derived peptides enhances melanoma invasion by up-regulating matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) expression and activation.', *Journal Of Investigative Dermatology*, 122 (2004), 256-265.
- 574 Ntayi, C., et al., 'Cumulative influence of matrix metalloproteinase-1 and -2 in the migration of melanoma cells within three-dimensional type I collagen lattices. ', *Experimental Cell Research*, 270 (2001), 110-118.
- 575 Numasaki, M. et al., 'Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth.', *Blood*, 101 (2003), 2620–2627.
- 576 Nunes, J. et al. , 'Circulating sphingosine-1-phosphate and erythrocyte sphingosine kinase-1 activity as novel biomarkers for early prostate cancer detection.', *British Journal Of Cancer*, 106 (2012), 909–915.
- 577 Nutt, S.L. , et al., 'The generation of antibody-secreting plasma cells.', *Nature Reviews Immunology*, 15 (2015), 160–171.
- 578 O'Garra, A. , and Vieira, P., 'Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. ', *Nature Medicine*, 10 (2004), 801-805.

- 579 O'Reilly, M.S. et al., 'Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. ', *Cell*, 88 (1997), 277–285.
- 580 O'Shea, J.J., and Paul, W.E., 'Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. ', *Science*, 327 (2010), 1098–1102.
- 581 Odegaard, J.I. et al., 'Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. ', *Cell Metabolism*, 7 (2008), 496–507.
- 582 Odegaard, J.I. et al., 'Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance.', *Nature*, 447 (2007), 1116–1120.
- 583 Oestreich, K. J., and Weinmann, A.S., 'Transcriptional mechanisms that regulate T helper 1 cell differentiation.', *Current Opinion In Immunology*, 24 (2012), 191–195.
- 584 Ogawa, C., et al., 'Identification and characterization of a novel human sphingosine 1-phosphate phosphohydrolase, hSPP2. ', *Journal Of Biological Chemistry*, 278 (2003), 1268–1272.
- 585 Ohkawa, R. et al. , 'Plasma sphingosine-1-phosphate measurement in healthy subjects: Close correlation with red blood cell parameters. ', *Annals of Clinical Biochemistry*, 45 (2008), 356–363.
- 586 Ohmori, T. et al., 'Sphingosine 1-phosphate induces contraction of coronary artery smooth muscle cells via S1P2. ', *Cardiovascular Research*, 58 (2003), 170–177.
- 587 Ohnishi, Y. , et al., 'Coordinate expression of membrane type-matrix metalloproteinases-2 and 3 (MT2-MMP and MT3-MMP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in primary and metastatic melanoma cells.', *European Journal Of Dermatology*, 11 (2001), 420-423.
- 588 Okada, T. et al. , 'Involvement of N-terminal-extended form of sphingosine kinase 2 in serum-dependent regulation of cell proliferation and apoptosis. ', *Journal Of Biological Chemistry*, 280 (2005), 36318–36325.
- 589 Okamoto, H. , et al., 'Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3.', *Molecular And Cellular Biology*, 20 (2000), 9247-9261.
- 590 Okoshi, H. et al., 'Cell membrane signaling as target in cancer therapy II: Inhibitory effect of N, N, N-trimethylsphingosine on metastatic potential of murine B16 melanoma cell line through blocking of tumor cell-dependent platelet aggregation.', *Cancer Research*, 51 (1991), 6019.
- 591 Okuda, H. et al., 'Hyaluronan synthase HAS2 promotes tumor progression in bone by stimulating the interaction of breast cancer stem-like cells with macrophages and stromal cells.', *Cancer Research*, 72 (2012), 537–547.
- 592 Olivera, A. , and Rivera, J., 'Sphingolipids and the balancing of immune cell function: lessons from the mast cell. ', *Journal Of Immunology*, 174 (2005), 1153-1158
- 593 Olivera, A. , and Spiegel, S. , 'Sphingosine 1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens.', *Nature*, 365 (1993), 557–559.
- 594 Olivera, A. et al., 'Sphingosine Kinase Expression Increases Intracellular Sphingosine-1-Phosphate and Promotes Cell Growth and Survival.', *Journal Of Cell Biology*, 147 (1999), 545–558.

- 595 Olivera, A. et al. , 'The sphingosine kinase-sphingosine- 1-phosphate axis is a determinant of mast cell function and anaphylaxis.', *Immunity*, 26 (2007), 287–297.
- 596 Olivera, A. et al. , 'IgE-dependent activation of sphingosine kinases 1 and 2 and secretion of sphingosine 1-phosphate requires Fyn kinase and contributes to mast cell responses.', *Journal Of Biological Chemistry*, 281 (2006), 2515–2525.
- 597 Orr Gandy, K.A. , and Obeid, L.M., 'Targeting the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate pathway in disease: Review of sphingosine kinase inhibitors', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1831 (2013), 157–166.
- 598 Oskeritzian, C.A. et al. , 'Distinct roles of sphingosine kinases 1 and 2 in human mast cell functions. ', *Blood*, 111 (2008), 4193–4200.
- 599 Oskouian, B. et al., 'Sphingosine-1-phosphate lyase potentiates apoptosis via p53- and p38-dependent pathways and is downregulated in colon cancer.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (2006), 17384–17389.
- 600 Oskouian, B. et al. , 'Regulation of sphingosine-1-phosphate lyase gene expression by members of the GATA family of transcription factors.', *Journal Of Biological Chemistry*, 280 (2005), 18403–18410.
- 601 Ostrand-Rosenberg, S. , 'Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting anti-tumor immunity.', *Cancer Immunology Immunotherapy*, 59 (2010), 1593-1600.
- 602 Ouyang, W. et al., 'The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation.', *Immunity*, 28 (2008), 454–467.
- 603 Ouyang, W. et al., 'Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment.', *Immunity*, 12 (2000), 27–37.
- 604 Overall, C.M., and Kleinfeld, O., 'Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. ', *Nature Reviews Cancer*, 6 (2006), 227-239.
- 605 Packer, L., et al., 'Osteopontin is a downstream effector of the PI3-kinase pathway in melanomas that is inversely correlated with functional PTEN.', *Carcinogenesis*, 27 (2006), 1778-1786.
- 606 Pages, F. et al. , 'In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer.', *Journal Of Clinical Oncology*, 27 (2009), 5944–5951.
- 607 Paik, J.H. , et al., 'Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of alpha vbeta3- and beta1-containing integrins.', *Journal Of Biological Chemistry*, 276 (2001), 11830-11837.
- 608 Palermo, C. , and Joyce, J.A., 'Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer.', *Trends In Pharmacological Sciences*, 29 (2008), 22-28.
- 609 Palma, L., et al., 'Lymphocytic infiltrates in primary glioblastomas and recidivous gliomas. Incidence, fate, and relevance to prognosis in 228 operated cases. ', *Journal of Neurosurgery*, 49 (1978), 854–861.

- 610 Pan, P.Y. et al. , 'Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer.', *Cancer Research*, 70 (2010), 99-108.
- 611 Pappo, A.S., et al., 'Melanoma as a subsequent neoplasm in adult survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study.', *Pediatric Blood & Cancer*, 60 (2013), 461-466.
- 612 Pardoll, D.M., 'The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy', *Nature Reviews Cancer*, 12 (2012), 252-264.
- 613 Park, S.H., et al., 'The contribution of NKT cells, NK cells, and other γ -chain-dependent non-T non-B cells to IL-12-mediated rejection of tumors.', *Journal Of Immunology*, 170 (2003), 1197–1201.
- 614 Park, S.J. et al., 'Sphingosine 1-phosphate induced antiatherogenic and atheroprotective M2 macrophage polarization through IL-4.', *Cell Signaling*, 26 (2014), 2249-2258.
- 615 Parkhurst, M.R., et al., 'Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression.', *Clinical Cancer Research*, 17 (2011), 6287-6297.
- 616 Parrill, A.L. , et al., 'Identification of Edg1 receptor residues that recognize sphingosine 1-phosphate.', *Journal Of Biological Chemistry*, 275 (2000), 39379-39384.
- 617 Paschen, A. et al., 'Differential clinical significance of individual NKG2D ligands in melanoma: soluble ULBP2 as an indicator of poor prognosis superior to S100B.', *Clinical Cancer Research*, 15 (2009), 5208–5215.
- 618 Pasco, S., et al., 'Control of melanoma progression by various matrikines from basement membrane macromolecules', *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 49 (2004), 221–233.
- 619 Pastoride, G.C. et al. , 'Image analysis of stage 1 melanoma (1. 00–2. 50 mm): lymphocytic infiltrates related to metastasis and survival. ', *Journal Of Cutaneous Pathology*, 19 (1992), 390-397.
- 620 Patwardhan, N.N., 'Structure-activity relationship studies and in vivo activity of guanidine-based sphingosine kinase inhibitors: discovery of SphK1- and SphK2-selective inhibitors.', *Journal of Medicinal Chemistry*, 58 (2015), 1879-1899.
- 621 Paugh, S.W. et al., 'A selective sphingosine kinase 1 inhibitor integrates multiple molecular therapeutic targets in human leukemia.', *Blood*, 112 (2008), 1382–1391.
- 622 Pauleau, A.L. et al., 'Enhancer-mediated control of macrophage-specific arginase I expression.', *Journal Of Immunology*, 172 (2004), 7565–7573.
- 623 Payne, A.S. , and Cornelius, L.A., 'The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis.', *Journal Of Investigative Dermatology*, 118 (2002), 915-922.
- 624 Payne, S.G., et al., 'Sphingosine-1-phosphate: Dual messenger functions.', *FEBS Letters*, 531 (2002), 54–57.
- 625 Pchejetski, D. et al., 'Chemosensitizing effects of sphingosine kinase-1 inhibition in prostate cancer cell and animal models.', *Molecular Cancer Therapeutics*, 7 (2008), 1836–1845.

- 626 Pchejetski, D. et al., 'The involvement of sphingosine kinase 1 in LPS-induced Toll-like receptor 4-mediated accumulation of HIF-1alpha protein, activation of ASK1 and production of the proinflammatory cytokine IL-6.', *Immunology and Cell Biology*, 89 (2011), 268–274.
- 627 Pchejetski, D. et al. , 'FTY720 (Fingolimod) sensitizes prostate cancer cells to radiotherapy by inhibition of sphingosine kinase-1.', *Cancer Research*, 70 (2010), 8651–8661.
- 628 Pchejetski, D. et al. , 'Sphingosine kinase-1 as a chemotherapy sensor in prostate adenocarcinoma cell and mouse models. ', *Cancer Research*, 65 (2005), 11667–11675.
- 629 Pearce, E.J. et al., 'Pillars article: downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. J. Exp.Med. 1991. 173: 159–166.', *Journal Of Immunology*, 189 (2012), 1104–1111.
- 630 Peggs, K.S. , et al., 'Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies.', *Journal Of Experimental Medicine*, 206 (2009), 1717–1725.
- 631 Pello, O.M. et al., 'Role of c-Myc in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology.', *Blood*, 119 (2012), 411–421.
- 632 Pende D, et al., 'PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: involvement in tumor cell lysis.', *Molecular Immunology*, 42 (2005), 463–469.
- 633 Pende, D. et al., 'Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells.', *Journal Of Experimental Medicine*, 190 (1999), 1505–1516.
- 634 Pende, D. et al., 'The susceptibility to natural killer cell-mediated lysis of HLA class I-positive melanomas reflects the expression of insufficient amounts of different HLA class I alleles. ', *European Journal Of Immunology*, 28 (1998), 2384–2394.
- 635 Peralbo, E. et al., 'Decreased frequency and proliferative response of invariant Valpha24Vbeta11 natural killer T (iNKT) cells in healthy elderly', *Biogerontology*, 7 (2006), 483–492.
- 636 Peranzoni, E. et al. , 'Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. ', *Current Opinion In Immunology*, 22 (2010), 238-244.
- 637 Permpongkosol, S. et al., 'Anticarcinogenic effect of FTY720 in human prostate carcinoma DU145 cells: Modulation of mitogenic signaling, FAK, cell-cycle entry and apoptosis.', *International Journal Of Cancer*, 98 (2002), 167–172.
- 638 Perrotta, R., et al., 'Serum markers of cutaneous melanoma. ', *Frontiers in Bioscience*, 2 (2010), 1115-1122.
- 639 Pessino, A. et al., 'Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity.', *Journal Of Experimental Medicine*, 188 (1998), 953–960.
- 640 Peter, B.F. et al., 'Role of sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase 1 in the regulation of resistance artery tone. ', *Circulation Research*, 103 (2008), 315–324.

- 641 Petrella, T.M. et al., 'Interleukin-21 has activity in patients with metastatic melanoma: a phase II study.', *Journal Of Clinical Oncology*, 30 (2012), 3396-3401.
- 642 Pettus, B.J. et al. , 'The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF-alpha.', *FASEB Journal*, 17 (2003), 1411-1421.
- 643 Pietras, K., and Ostman, A. , 'Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma.', *Experimental Cell Research*, 316 (2010), 1324-1331.
- 644 Pinschewer, D.D. et al. , 'FTY720 immunosuppression impairs effector T-cell peripheral homing without affecting induction, expansion and memory. ', *Journal Of Immunology*, 164 (2000), 5761–5770.
- 645 Pitman, M.R. , and Pitson, S.M. , 'Inhibitors of the sphingosine kinase pathway as potential therapeutics. ', *Current Cancer Drug Targets*, 10 (2010), 354–367.
- 646 Pitson, S.M. , 'Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling.', *Trends in Biochemical Sciences*, 36 (2011), 97–107.
- 647 Pitson, S.M. et al. , 'Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation. ', *EMBO Journal*, 22 (2003), 5491–5500.
- 648 Pitson, S.M. et al. , 'Expression of a catalytically inactive sphingosine kinase mutant blocks agonist-induced sphingosine kinase activation. A dominant-negative sphingosine kinase. ', *Journal Of Biological Chemistry*, 275 (2000), 33945–33950.
- 649 Pitson, S.M. et al. , 'Phosphorylation-dependent translocation of sphingosine kinase to the plasma membrane drives its oncogenic signalling.', *The Journal of Experimental Medicine*, 201 (2005), 49–54.
- 650 Pogenberg, V. , et al., 'Restricted leucine zipper dimerization and specificity of DNA recognition of the melanocyte master regulator MITF.', *Genes & Development*, 26 (2012), 2647-2658.
- 651 Pollard, J.W. , 'Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. ', *Nature Reviews Cancer*, 4 (2004), 71-78.
- 652 Pomerantz, J. et al. , 'The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53.', *Cell*, 92 (1998), 713-723.
- 653 Postow, M. A. et al. , 'Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. ', *New England Journal Of Medicine*, 21 (2015), 2006-2017.
- 654 Poulidakos, P.I., et al., 'RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. ', *Nature*, 464 (2011), 427–430.
- 655 Prada, F., et al., 'SPARC endogenous level, rather than fibroblast-produced SPARC or stroma reorganization induced by SPARC, is responsible for melanoma cell growth. ', *Journal Of Investigative Dermatology*, 127 (2007), 2618-2628.
- 656 Pratilas, C.A., and Solit, D.B. , 'Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. ', *Clinical Cancer Research*, 16 (2010), 3329-3334.

- 657 Preston, C.C. et al., 'The ratios of CD8+ T cells to CD4+CD25+ FOXP3+ and FOXP3- T cells correlate with poor clinical outcome in human serous ovarian cancer.', *PLOS ONE*, 8 (2013), e80063.
- 658 Preynat-Seauve, O., et al., 'Melanoma-infiltrating dendritic cells induce protective anti-tumor responses mediated by T-cells.', *Melanoma Research*, 17 (2007), 169–176.
- 659 Preynat-Seauve, O., et al., 'Tumor-infiltrating dendritic cells are potent antigen-presenting cells able to activate T-cells and mediate tumor rejection.', *Journal Of Immunology*, 176 (2006), 61–67.
- 660 Prieschl, E.E., et al., 'The balance between sphingosine and sphingosine-1-phosphate is decisive for mast cell activation after FcεRI triggering.', *Journal Of Experimental Medicine*, 190 (1999), 1–8.
- 661 Prieto, P.A. et al., 'CTLA-4 blockade with ipilimumab: long-term follow-up of 177 patients with metastatic melanoma.', *Clinical Cancer Research*, 18 (2012), 2039-2047.
- 662 Pu, Y.S. et al. , 'Interleukin-6 is responsible for drug resistance and anti-apoptotic effects in prostatic cancer cells. ', *Prostate*, 60 (2004), 120-129.
- 663 Puig-Kröger, A. et al., 'Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages.', *Cancer Research*, 69 (2009), 9395–9403.
- 664 Puneet, P. et al. , 'SphK1 regulates proinflammatory responses associated with endotoxin and polymicrobial sepsis. ', *Science*, 328 (2010), 1290–1294.
- 665 Purwar, R. et al., 'Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells.', *Nature Medicine*, 18 (2012), 1248–1253.
- 666 Pyne, N.J. , and Pyne, S., 'Sphingosine 1-phosphate and cancer.', *Nature Reviews Cancer*, 10 (2010), 489-503.
- 667 Pyne, S., and Pyne, N.J. , 'Sphingosine 1-phosphate signalling and termination at lipid phosphate receptors.', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1582 (2002), 121-131.
- 668 Pyonteck, S.M. et al., 'CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression.', *Nature Medicine*, 19 (2013), 1264–1272.
- 669 Qian, B.Z. et al., 'CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis.', *Nature*, 475 (2011), 222–225.
- 670 Qian, B.Z., and Pollard, J.W., 'Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis.', *Cell*, 141 (2010), 39–51.
- 671 Quail, D.F., and Joyce, J.A., 'Multiple stromal cell types converge to support a tumorigenic primary niche.', *Nature Medicine*, 19 (2013), 1423–1437.
- 672 Quail, D.F., and Joyce, J.A. , 'Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis.', *Nature Medicine*, 19 (2013), 1423–1437.
- 673 Quéreux, G. , and Dréno, B. , 'Fotemustine for the treatment of melanoma.', *Expert Opinion On Pharmacotherapy*, 12 (2011), 2891-2904.

- 674 Quinn, S.R., and O'Neill, L.A., 'A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling.', *International Immunology*, 23 (2011), 421–425.
- 675 Quintanilla-Dieck, M.J., et al., 'Cathepsin K in melanoma invasion.', *Journal Of Investigative Dermatology*, 128 (2008), 2281-2288.
- 676 Rahimi, R.A. , and Leof, E.B. , 'TGF-beta signaling: a tale of two responses.', *Journal of Cellular Biochemistry*, 102 (2007), 593–608.
- 677 Ramaswamy, S. et al. , 'A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. ', *Nature Genetics*, 33 (2003), 49–54.
- 678 Ramchandran, R. et al., 'Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: comparison to endostatin.', *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 255 (1999), 735–739.
- 679 Ramesh, S., et al., 'Transforming growth factor β (TGF β)-induced apoptosis: the rise and fall of Bim.', *Cell Cycle*, 8 (2009), 11–17
- 680 Randolph, D.A., and Fathman, C.G., 'CD4+CD25+ regulatory T cells and their therapeutic potential.', *Annual Review of Medicine*, 57 (2006), 381–402.
- 681 Räsänen, K., and Vaheri, A. , 'Activation of fibroblasts in cancer stroma.', *Experimental Cell Research*, 316 (2010), 2713-2722.
- 682 Rasku, M.A. et al., 'Transient T cell depletion causes regression of melanoma metastases.', *Journal of Translational Medicine*, 6 (2008).
- 683 Ratain, M. et al. , 'Preliminary antitumor activity of BAY 43–9006 in metastatic renal cell carcinoma and other advanced refractory solid tumors in a phase II Randomized Discontinuation Trial (RDT).', *Journal Of Clinical Oncology*, 22 (2004), 4501.
- 684 Raza, A., et al., 'Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. ', *American Journal Of Hematology*, 85 (2010), 593-598.
- 685 Rech, A.J., and Vonderheide, R.H., 'Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells.', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1174 (2009), 99–106.
- 686 Recio, J.A. et al. , 'Ink4a/arf deficiency promotes ultraviolet radiation-induced melanomagenesis.', *Cancer Research*, 62 (2002), 6724-6730.
- 687 Rehn, M. et al. , 'Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (2001), 1024–1029.
- 688 Reiss, U. et al. , 'Sphingosine-phosphate lyase enhances stressinduced ceramide generation and apoptosis. ', *Journal Of Biological Chemistry*, 279 (2004), 1281-1290.
- 689 Renukaradhya, G.J. et al. , 'Type I NKT cells protect (and type II NKT cells suppress) the host's innate antitumor immune response to a B-cell lymphoma.', *Blood*, 111 (2008), 5637–5645.
- 690 Rey, J. et al., 'New insights into cytotoxic effector cells.', *Bulletin Du Cancer*, 92 (2005), 935-943.

- 691 Rezze, G.G., et al., 'Structural correlations between dermoscopic features of cutaneous melanomas and histopathology using transverse sections. ', *American Journal Of Dermatopathology*, 28 (2006), 13-20.
- 692 Ribas, A. , et al., 'Phase III randomized clinical trial comparing tremelimumab with standard-of-care chemotherapy in patients with advanced melanoma. ', *Journal Of Clinical Oncology*, 31 (2013), 616-622.
- 693 Ribas, A. et al., 'Efficacy and safety of the anti-PD-1 monoclonal antibody MK-3475 in 411 patients with melanoma ', *Journal of clinical oncology (Meeting abstracts)*, 32 (2014).
- 694 Ribas, A. et al. , 'Dendritic cell vaccination combined with CTLA4 blockade in patients with metastatic melanoma. ', *Clinical Cancer Research*, 15 (2009), 6267-6276.
- 695 Ries, C.H. et al., 'Targeting Tumor-Associated Macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy.', *Cancer Cell*, 25 (2014), 846–859.
- 696 Rigel, D.S. , et al., 'The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs.', *Ca-A Cancer Journal For Clinicians*, 60 (2010), 301-316.
- 697 Rigogliuso, S. et al. , 'An active form of sphingosine kinase-1 is released in the extracellular medium as component of membrane vesicles shed by two human tumor cell lines.', *Journal of Oncology*, 2010 (2010), 509329-509339.
- 698 Riley, J. L. et al. , 'Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS, and CTLA-4 receptors. ', *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States Of America (PNAS)*, 99 (2002), 11790-11795.
- 699 Rimm, D.L. , et al., 'Frequent nuclear/cytoplasmic localization of beta-catenin without exon 3 mutations in malignant melanoma.', *American Journal Of Pathology*, 154 (1999), 325-329.
- 700 Rivera, J. , et al., 'The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity.', *Nature Reviews Immunology*, 8 (2008), 753-763.
- 701 Rivoltini, L. et al. , 'Escape strategies and reasons for failure in the interaction between tumour cells and the immune system: how can we tilt the balance towards immune-mediated cancer control? ', *Expert Opinion On Biological Therapy*, 5 (2005), 463-476.
- 702 Robert, C. et al., 'Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. ', *Lancet*, 384 (2014), 1109-1117.
- 703 Robert, C. et al., 'Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. ', *New England Journal Of Medicine*, 364 (2011), 2517-2526.
- 704 Roberts, J.L., et al., 'An assay for sphingosine kinase activity using biotinylated sphingosine and streptavidin-coated membranes. ', *Analytical Biochemistry*, 331 (2004), 122–129.
- 705 Robinson, D.S. et al., 'Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma.', *New England Journal Of Medicine*, 326 (1992), 298–304.
- 706 Roca, H. et al., 'CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization.', *Journal Of Biological Chemistry*, 284 (2009), 34342–34354.

- 707 Romano, E. et al., 'Peptide-loaded Langerhans cells, despite increased IL15 secretion and T-cell activation in vitro, elicit antitumor T-cell responses comparable to peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells in vivo. ', *Clinical Cancer Research*, 17 (2011), 1984-1997.
- 708 Roncarolo, M.G. et al., 'Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans.', *Immunological Reviews*, 212 (2006), 28–50.
- 709 Rosenberg, S.A., 'Decade in review—cancer immunotherapy: Entering the mainstream of cancer treatment', *Nature Reviews Clinical Oncology*, 11 (2014), 630–632.
- 710 Rosenberg, S.A., 'Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. ', *Journal Of The National Cancer Institute*, 85 (1993).
- 711 Rosenberg, S.A. et al., 'Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. ', *Clinical Cancer Research*, 17 (2011), 4550-4557.
- 712 Rotondo, R. et al., 'IL-8 induces exocytosis of arginase 1 by neutrophil polymorphonuclears in nonsmall cell lung cancer.', *International Journal Of Cancer*, 125 (2009), 887-893.
- 713 Roudi, R., 'Comparative gene-expression profiling of CD133(+) and CD133(-) D10 melanoma cells.', *Future Oncology*, 11 (2015), 2383-2393.
- 714 Roux, J. , et al., 'Targeted molecular therapies (except immunotherapy)', *Bulletin Du Cancer*, 101 (2014), S25-36.
- 715 Rubtsov, Y.P. , and Rudensky, A.Y., 'TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity.', *Nature Reviews Immunology*, 7 (2007), 443-453.
- 716 Rubtsov, Y.P. , and Rudensky, A.Y. , 'TGFβ signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity.', *Nature Reviews Immunology*, 7 (2007), 443–453.
- 717 Rudd, C.E., et al., 'CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction.', *Immunological Reviews*, 229 (2009), 12-26.
- 718 Ruitter, D., et al., 'Melanoma–stroma interactions: structural and functional aspects', *Lancet Oncology*, 3 (2002), 35-43.
- 719 Ruoslahti, E. , 'Specialization of tumour vasculature.', *Nature Reviews Cancer*, 2 (2002), 83-90.
- 720 Rutella, S., et al., 'Tolerogenic dendritic cells: Cytokine modulation comes of age. ', *Blood*, 108 (2006), 1435–1440.
- 721 Sabourdy, F. et al. , 'Functions of sphingolipid metabolism in mammals-lessons from genetic defects.', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1781 (2008), 145-183.
- 722 Saccani, A. et al., 'p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance.', *Cancer Research*, 66 (2006), 11432–11440.
- 723 Sakaguchi, S. , et al., 'FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system.', *Nature Reviews Immunology*, 10 (2010), 490–500.

- 724 Sakaguchi, S., et al., 'Regulatory T cells and immune tolerance.', *Cell*, 133 (2008), 775–787.
- 725 Sallusto, F. , et al., 'Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions.', *Nature*, 401 (1999), 708-712.
- 726 Salomone, S. et al., 'Analysis of sphingosine 1-phosphate receptors involved in constriction of isolated cerebral arteries with receptor null mice and pharmacological tools.', *British Journal Of Pharmacology*, 153 (2008), 140–147.
- 727 Salvesen, H.B. , and Akslen, L.A. , 'Significance of tumour-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas.', *International Journal Of Cancer*, 84 (1999), 538–543.
- 728 Sanchez, T., and Hla, T. , 'Structural and functional characteristics of S1P receptors.', *Journal of Cellular Biochemistry*, 92 (2004), 913–922.
- 729 Sangaletti, S. et al., 'Macrophage-derived SPARC bridges tumor cell-extracellular matrix interactions toward metastasis.', *Cancer Research*, 68 (2008), 9050–9059.
- 730 Sankala, H.M. et al. , 'Involvement of sphingosine kinase 2 in p53-independent induction of p21 by the chemotherapeutic drug doxorubicin.', *Cancer Research*, 67 (2007), 10466–10474.
- 731 Santamaria, P. , 'Effector lymphocytes in autoimmunity.', *Current Opinion In Immunology*, 13 (2001), 663-669.
- 732 Santé., Haute Autorité de, 'Stratégie de diagnostique précoce du mélanome. Recommandation en santé publique. Rapport d'évaluation. ', (2006).
- 733 Sarkar, D. et al., 'Epigenetic regulation in human melanoma: past and future', *Epigenetics*, 10 (2015), 103-121.
- 734 Sato, E. et al. , 'Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. ', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (2005), 18538–18543.
- 735 Sato, K. et al. , 'TGF- β 1 reciprocally controls chemotaxis of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells via chemokine receptors. ', *Journal Of Immunology*, 164 (2000), 2285–2295.
- 736 Sato, K., et al., 'Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes.', *Journal of Neurochemistry*, 103 (2007), 2610-2619.
- 737 Satoh, T. et al., 'The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection.', *Nature Immunology*, 11 (2010), 936–944.
- 738 Sauer, L. et al., 'Sphingosine kinase 1 inhibition sensitizes hormone-resistant prostate cancer to docetaxel.', *International Journal Of Cancer*, 125 (2009), 2728–2736.
- 739 Schadendorf, D. , and Hauschild, A., 'Melanoma in 2013: Melanoma—the run of success continues.', *Nature Reviews Clinical Oncology*, 11 (2014), 75-76.
- 740 Schadendorf, D., et al., 'Melanoma', *Nature Reviews Disease Primers*, 1 (2015), 1-20.

- 741 Schioppa, T. et al. , 'Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia', *Journal Of Experimental Medicine*, 198 (2003), 1391–1402.
- 742 Schmahl, J. et al. , 'PDGF signaling specificity is mediated through multiple immediate early genes. ', *Nature Genetics*, 39 (2006), 52–60.
- 743 Schneider, H. et al. , 'Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. ', *Science*, 313 (2006), 1972-1975.
- 744 Schneiders, F.L. et al. , 'Circulating invariant natural killer T-cell numbers predict outcome in head and neck squamous cell carcinoma: updated analysis with 10-year follow-up.', *Journal Of Clinical Oncology*, 30 (2012), 567–570.
- 745 Schnitzer, S.E., et al., 'Hypoxia enhances sphingosine kinase 2 activity and provokes sphingosine-1-phosphate-mediated chemoresistance in A549 lung cancer cells.', *Molecular Cancer Research*, 7 (2009), 393–401.
- 746 Scholl, S.M. et al., 'Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. ', *Journal Of The National Cancer Institute*, 86 (1994), 120–126.
- 747 Schwartz, G. et al., 'A pilot clinical/pharmacological study of the protein kinase C-specific inhibitor safingol alone and in combination with doxorubicin.', *Clinical Cancer Research*, 3 (1997), 537.
- 748 Schwartz, R.H. , 'Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. ', *Cell*, 71 (1992), 1065-1068.
- 749 Schwartzentruher, D.J. et al. , 'gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. ', *New England Journal Of Medicine*, 364 (2011), 2119-2127.
- 750 Scott, A.M. , et al., 'Antibody therapy of cancer. ', *Nature Reviews Cancer*, 12 (2012), 278-287.
- 751 Seftor, R.E.B. et al. , 'Role of the $\alpha\beta 3$ integrin in human melanoma cell invasion. ', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89 (1992), 1557-1561.
- 752 Seliger, B. , 'Novel insights into the molecular mechanisms of HLA class I abnormalities. ', *Cancer Immunology Immunotherapy*, 61 (2012), 249-254.
- 753 Serrano, A.E. et al., 'Interleukin 10 decreases MICA expression on melanoma cell surface.', *Immunology & Cell Biology*, 89 (2011), 447–457.
- 754 Serrano, M. , et al., 'Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality.', *Cell*, 85 (1996), 27-37.
- 755 Serrone, L. , et al., 'Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. ', *Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research*, 19 (2000), 21-34.
- 756 Shah, M. et al. , 'A role for ATF2 in regulating MITF and melanoma development.', *PLoS genetics*, 6 (2010), e1001258.
- 757 Shamamian, P. et al., 'Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: a role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis.', *Journal of Cellular Physiology*, 189 (2001), 197–206.

- 758 Sharma, A.K., 'Sphingo-guanidines and their use as inhibitors of sphingosine kinase (WO2010078247).', *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 21 (2011), 807–812.
- 759 Sharma, B. et al. , 'Antisense targeting of perlecan blocks tumor growth and angiogenesis in vivo. ', *Journal Of Clinical Investigation*, 102 (1998), 1599-1608.
- 760 Sharpless, E. , and Chin, L. , 'The INK4a/ARF locus and melanoma.', *Oncogene*, 22 (2003), 3092-3098.
- 761 Sharpless, N.E. , et al., 'The differential impact of p16(INK4a) or p19(ARF) deficiency on cell growth and tumorigenesis. ', *Oncogene*, 23 (2004), 379-385.
- 762 Sherr, C.J., and Roberts, J.M. , 'Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases.', *Genes & Development*, 18 (2004), 2699-2711.
- 763 Shi, H. et al. , 'Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy.', *Cancer Discovery*, 4 (2014), 80-93.
- 764 Shi, Y. , and Massague, J. , 'Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus.', *Cell*, 113 (2003), 685–700.
- 765 Shiao, S.L. et al., 'TH2-polarized CD4+ T cells and macrophages limit efficacy of radiation therapy.', *Cancer Immunology Research*, 3 (2015), 518–525.
- 766 Shida, D. et al., 'Crosstalk between LPA1 and epidermal growth factor receptors mediates up-regulation of sphingosine kinase 1 to promote gastric cancer cell motility and invasion. ', *Cancer Research*, 68 (2008), 6569–6577.
- 767 Shimizu, H. et al. , 'KRP-203, a novel synthetic immunosuppressant, prolongs graft survival and attenuates chronic rejection in rat skin and heart allografts. ', *Circulation*, 111 (2005), 222–229.
- 768 Shimizu, K. , et al., 'Cross-presentation of glycolipid from tumor cells loaded with α -galactosylceramide leads to potent and long-lived T cell mediated immunity via dendritic cells.', *Journal Of Experimental Medicine*, 204 (2007), 2641–2653
- 769 Shimoda, H. et al., 'Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene.', *Nature*, 380 (1996), 630–633.
- 770 Shtivelman, E. , et al., 'Pathways and therapeutic targets in melanoma.', *Oncotarget*, 5 (2014), 1701-1752.
- 771 Shu, X. et al., 'Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases.', *Molecular And Cellular Biology*, 22 (2002), 7758-7768.
- 772 Shull, M.M. et al., 'Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. ', *Nature*, 359 (1992), 693–699
- 773 Shurin, M.R. , et al., 'Regulatory dendritic cells: new targets for cancer immunotherapy.', *Cancer Biology & Therapy*, 11 (2011), 988-992.
- 774 Si, L. et al. , 'Major response to everolimus in melanoma with acquired imatinib resistance.', *Journal Of Clinical Oncology*, 30 (2012), e37-40.

- 775 Sica, A. , and Mantovani, A., 'Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas.', *Journal Of Clinical Investigation*, 122 (2012), 787-795.
- 776 Sica, A., and Bronte, V. , 'Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development.', *Journal Of Clinical Investigation*, 117 (2007), 1155–1166.
- 777 Sica, A. et al., 'Defective expression of the monocyte chemotactic protein-1 receptor CCR2 in macrophages associated with human ovarian carcinoma.', *Journal Of Immunology*, 164 (2000), 733–738.
- 778 Sica, A. et al. , 'Macrophage polarization in tumour progression.', *Seminars in Cancer Biology*, 18 (2008), 349-355.
- 779 Sierra-Filardi, E. et al., 'CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: Identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile.', *Journal Of Immunology*, 192 (2014), 3858–3867.
- 780 Silletti, S. , et al., 'Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin $\alpha\beta3$ by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (2001), 119-124.
- 781 Silverberg, M.J. , et al., 'HIV infection, immunodeficiency, viral replication, and the risk of cancer. ', *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 20 (2011), 2551-2559.
- 782 Simonetti, O. et al. , 'Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 in cutaneous melanocytic lesions. ', *Cancer*, 95 (2002), 1963-1970.
- 783 Sivori, S. et al., 'NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells: correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. ', *European Journal Of Immunology*, 29 (1999), 1656–1666.
- 784 Slominski, A., et al., 'Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation.', *Physiological Reviews*, 84 (2004), 1155–1228.
- 785 Smalley, K.S., 'Understanding melanoma signaling networks as the basis for molecular targeted therapy.', *Journal Of Investigative Dermatology*, 130 (2010), 28-37.
- 786 Smit, D.J., et al., 'Osteonectin downregulates E-cadherin, induces osteopontin and focal adhesion kinase activity, stimulating an invasive melanoma phenotype. ', *International Journal Of Cancer*, 121 (2007), 2653–2660.
- 787 Smyth, M.J. et al. , 'Sequential production of interferon- γ by NK1.1+ T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of α -galactosylceramide.', *Blood*, 99 (2002), 1259–1266.
- 788 Solana, R. et al., 'Lymphocyte activation in response to melanoma: interaction of NK-associated receptors and their ligands.', *Cancer Immunology Immunotherapy*, 56 (2007), 101–109.
- 789 Soldi, R. et al., 'Sphingosine kinase 1 is a critical component of the copper-dependent FGF1 export pathway.', *Experimental Cell Research*, 313 (2007), 3308–3318.

- 790 Solinas, G., et al., 'Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation.', *Journal of Leukocyte Biology*, 86 (2009), 1065–1073.
- 791 Solinas, G.; et al., 'Tumor-conditioned macrophages secrete migration-stimulating factor: A new marker for M2-polarization, influencing tumor cell motility.', *Journal Of Immunology*, 185 (2010), 642–652.
- 792 Song, J. et al., 'A novel sphingosine 1-phosphate receptor agonist, KRP-203, regulates chronic colitis in IL-10 gene-deficient mice.', *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 324 (2008), 276–383.
- 793 Song, L. et al., 'Sphingosine kinase-1 enhances resistance to apoptosis through activation of PI3K/Akt/NF- κ B pathway in human non-small cell lung cancer. ', *Clinical Cancer Research*, 17 (2011), 1839–1849.
- 794 Song, L. et al. , ' α 24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages. ', *Journal Of Clinical Investigation*, 119 (2009), 1524–1536.
- 795 Sosman, J. A. et al. , 'Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib.', *New England Journal Of Medicine*, 366 (2012), 707–714.
- 796 Spel, L. , et al., 'Antitumor immune responses mediated by dendritic cells: how signals derived from dying cancer cells drive antigen cross-presentation. ', *Oncoimmunology*, 2 (2013), e26403.
- 797 Spicer, J.D. et al., 'Neutrophils promote liver metastasis via Mac-1-mediated interactions with circulating tumor cells.', *Cancer Research*, 72 (2012), 3919-3927.
- 798 Spiegel, S., and Kolesnick, R. , 'Sphingosine 1-phosphate as a therapeutic agent.', *Leukemia*, 16 (2002), 1596-1602.
- 799 Spiegel, S., and Milstien, S. , 'Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. ', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4 (2003), 397–407.
- 800 Stahelin, R.V. et al., 'The mechanism of membrane targeting of human sphingosine kinase 1. ', *Journal Of Biological Chemistry*, 280 (2005), 43030–43038.
- 801 Stahl, J.M. , et al., 'Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. ', *Cancer Research*, 63 (2003), 2881-2890.
- 802 Stahl, J.M. , et al., 'Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma.', *Cancer Research*, 64 (2004), 7002-7010.
- 803 Stauss, H.J., and Morris, E.C. , 'Immunotherapy with gene modified T cells: limiting side effects provides new challenges. ', *Gene therapy*, 20 (2013), 1029-1032.
- 804 Steer, H.J. , et al., 'Harnessing the immune response to treat cancer.', *Oncogene*, 29 (2010), 6301–6313.
- 805 Steidl, C. et al., 'Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma.', *New England Journal Of Medicine*, 362 (2010), 875–885.
- 806 Steinman, R.M. , 'Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. ', *Nature Medicine*, 13 (2007), 1155–1159.

- 807 Steinman, R.M. , and Banchereau, J. , 'Taking dendritic cells into medicine.', *Nature*, 449 (2007), 419-426.
- 808 Steinman, R.M., et al., 'Tolerogenic dendritic cells.', *Annual Review Of Immunology*, 21 (2003), 685-711.
- 809 Stetler-Stevenson, W.G. , and Yu, A.E. , 'Proteases in invasion: matrix metalloproteinases.', *Seminars in Cancer Biology*, 11 (2001), 143-152.
- 810 Stewart, T.J. , and Abrams, S.I. , 'How tumours escape mass destruction.', *Oncogene*, 27 (2008), 5894-5903.
- 811 Strachan, D.C. et al., 'CSF1R inhibition delays cervical and mammary tumor growth in murine models by attenuating the turnover of tumor-associated macrophages and enhancing infiltration by CD8(+) T cells. ', *Oncoimmunology*, 2 (2013), e26968.
- 812 Strell, C. et al., 'Neutrophil granulocytes promote the migratory activity of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells via ICAM-1. ', *Experimental Cell Research*, 316 (2010), 138-148.
- 813 Strub, G.M. et al. , 'Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 in mitochondria interacts with prohibitin 2 to regulate complex IV assembly and respiration. ', *FASEB Journal*, 25 (2011), 600–612.
- 814 Stuart, D.D. et al., 'Preclinical profile of LGX818: a potent and selective RAF kinase inhibitor. ', *Cancer Research*, 72 (2012), 3790.
- 815 Su, F. et al. , 'RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors.', *New England Journal Of Medicine*, 366 (2012), 207–215.
- 816 Su, X. et al., 'Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells.', *Journal Of Immunology*, 184 (2010), 1630–1641.
- 817 Sukocheva, O.A. et al., 'Sphingosine kinase transmits estrogen signaling in human breast cancer cells. ', *Molecular Endocrinology*, 17 (2003), 2002–2012.
- 818 Sutphen, R. et al. , 'Lysophospholipids are potential biomarkers of ovarian cancer. ', *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 13 (2004), 1185- 1191.
- 819 Swann, J.B., et al., 'CD1-restricted T cells and tumor immunity. ', *Current Topics In Microbiology And Immunology*, 314 (2007), 293–323.
- 820 Sweeney, E.A. et al., 'Sphingosine and its methylated derivative N, N-dimethylsphingosine (DMS) induce apoptosis in a variety of human cancer cell lines.', *International Journal Of Cancer*, 66 (1996), 358–366.
- 821 Szanto, A. et al., 'STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPAR γ regulated gene expression in macrophages and dendritic cells.', *Immunity*, 33 (2010), 699–712.
- 822 Sznol, M. et al. , 'Survival, response duration, and activity by BRAF mutation (MT) status of nivolumab (NIVO, anti-PD-1, BMS-936558, ONO-4538) and ipilimumab (IPI) concurrent therapy in advanced melanoma (MEL). ', (ASCO Annual Meeting: American Society of Clinical Oncology, 2014).

- 823 Tachibana, T. et al., 'Increased intratumor Vα24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas.', *Clinical Cancer Research*, 11 (2005), 7322–7327.
- 824 'Tafinlar (dabrafenib) Summary of Product Characteristics', (2013).
- 825 Tahara-Hanaoka, S. et al., 'Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). ', *International Immunology*, 16 (2004), 533–538.
- 826 Tahir, S.M. et al. , 'Loss of IFN-γ production by invariant NK T cells in advanced cancer.', *Journal Of Immunology*, 167 (2001), 4046–4050
- 827 Takabe, K., et al., 'Estradiol induces export of sphingosine-1-phosphate from breast cancer cells via ABCG1 and ABCG2. ', *Journal Of Biological Chemistry*, 285 (2010), 10477–10486.
- 828 Takabe, K., et al., '“Inside-out” signaling of sphingosine-1-phosphate: Therapeutic targets.', *Pharmacological Reviews*, 60 (2008), 181-195.
- 829 Takeda, N. et al., 'Differential activation and antagonistic function of HIF-1α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis.', *Genes & Development*, 24 (2010), 491–501.
- 830 Talks, K.L. et al., 'The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1α and HIF-2α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages.', *American Journal Of Pathology*, 157 (2000), 411–421.
- 831 Tang, A. , et al., 'E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro.', *Journal Of Cell Science*, 107 (1994), 983-992.
- 832 Tani, M., et al., 'Ceramide/sphingosine/sphingosine 1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space. ', *Cellular Signalling*, 19 (2007), 229–237.
- 833 Tas, F. et al. , 'Serum transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) levels have diagnostic, predictive, and possible prognostic roles in patients with melanoma.', *Tumour Biol*, 35 (2014), 7233-7237.
- 834 Tazawa, H. et al. , 'Infiltration of neutrophils is required for acquisition of metastatic phenotype of benign murine fibrosarcoma cells: implication of inflammation-associated carcinogenesis and tumor progression. ', *The American Journal of Pathology*, 163 (2003), 2221-2232.
- 835 Tazzyman, S. et al. , 'Inhibition of neutrophil infiltration into A549 lung tumors in vitro and in vivo using a CXCR2-specific antagonist is associated with reduced tumor growth.', *International Journal Of Cancer*, 129 (2011), 847-858.
- 836 Tazzyman, S., et al., 'Neutrophils: Key mediators of tumor angiogenesis. ', *International Journal Of Experimental Pathology*, 90 (2009), 222-231.
- 837 Terme, M. et al. , ' IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer.', *Cancer Research*, 71 (2011), 5393-5399.
- 838 Theilmeier, G. et al., 'High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor. ', *Circulation*, 114 (2006), 1403-1409.
- 839 Thompson, J.F. , et al., 'Cutaneous melanoma', *Lancet*, 365 (2005), 687-701.

- 840 Thurner, B. et al., 'Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. ', *Journal Of Experimental Medicine*, 190 (1999), 1669-1678.
- 841 Timar, J. et al. , 'Proteoglycans and tumor progression: Janus-faced molecules with contradictory functions in cancer.', *Seminars in Cancer Biology*, 12 (2002), 173-186.
- 842 Tivol, E.A. et al. , 'Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4.', *Immunity*, 3 (1995), 541-547.
- 843 Todd, J.R., et al., 'Secondary c-Kit mutations confer acquired resistance to RTK inhibitors in c-Kit mutant melanoma cells. ', *Pigment Cell & Melanoma Research*, 26 (2013), 518-526.
- 844 Tonelli, F. et al., 'FTY720 and (S)-FTY720 vinylphosphonate inhibit sphingosine kinase 1 and promote its proteasomal degradation in human pulmonary artery smooth muscle, breast cancer and androgen-independent prostate cancer cells.', *Cellular Signalling*, 22 (2010), 1536–1542.
- 845 Tong, Z. et al., 'A protective role by interleukin-17F in colon tumorigenesis.', *PLOS ONE*, 7 (2012), e34959.
- 846 Topalian, S.L. , et al., 'Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity.', *Current Opinion In Immunology*, 24 (2012), 207-212.
- 847 Tran, D.Q., et al., 'Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. ', *Blood*, 110 (2007), 2983–2990.
- 848 Trifari, S. et al., 'Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from TH-17, TH1 and TH2 cells.', *Nature Immunology*, 10 (2009), 864–871.
- 849 Trinchieri, G. , 'Biology of natural killer cells. ', *Advances In Immunology*, 47 (1989), 225-274.
- 850 Tsai, J. et al. , 'Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. ', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (2008), 3041–3046.
- 851 Tsao, H. , et al., 'Management of cutaneous melanoma. ', *New England Journal Of Medicine*, 351 (2004), 998-1012.
- 852 Tsao, H., et al., 'Early detection of melanoma: Reviewing the ABCDEs', *Journal of American Academy of Dermatology*, 72 (2015), 717-723.
- 853 Turk, M.J. et al., 'Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells.', *Journal Of Experimental Medicine*, 200 (2004), 771–782.
- 854 Umansky, V. , and Sevko, A. , 'Melanoma-induced immunosuppression and its neutralization. ', *Seminars in Cancer Biology*, 22 (2012), 319-326.
- 855 Uyttenhove, C. et al., 'TGF- β interactions with IL-1 family members trigger IL-4-independent IL-9 production by mouse CD4+ T cells.', *European Journal Of Immunology*, 40 (2010), 2230–2235.

- 856 Vadas, M. , et al., 'The role of sphingosine kinase 1 in cancer: oncogene or non-oncogene addiction?', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1781 (2008), 442-447.
- 857 Vallacchi, V. , and Rodolfo, M. , 'Regulatory role of CCN3 in melanoma cell interaction with the extracellular matrix. ', *Cell Adhesion and Migration*, 3 (2009), 7-10.
- 858 Valyi-Nagy, I.T. , et al., 'Undifferentiated keratinocytes control growth, morphology, and antigen expression of normal melanocytes through cell-cell contact.', *Laboratory Investigation*, 69 (1993), 152-159.
- 859 Van Brocklyn, J.R., et al., 'Sphingosine-1-phosphate is a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-6.', *Blood*, 95 (2000), 2624-2629.
- 860 Van Brocklyn, J.R., et al., 'Sphingosine-1-phosphate stimulates motility and invasiveness of human glioblastoma multiforme cells.', *Cancer Letters*, 199 (2003), 53–60.
- 861 Van den Oord, J.J. , et al., 'Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions on the skin.', *American Journal Of Pathology*, 151 (1997), 665-670.
- 862 Van Elsas, A., et al., 'Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colonystimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation.', *Journal Of Experimental Medicine*, 190 (1999), 355-366.
- 863 Van Veldhoven, P.P. , and Mannaerts, G.P., 'Subcellular localization and membrane topology of sphingosine-1-phosphate lyase in rat liver. ', *Journal Of Biological Chemistry*, 266 (1991), 12502–12507.
- 864 Van Veldhoven, P.P. et al., 'Human sphingosine-1-phosphate lyase: cDNA cloning, functional expression studies and mapping to chromosome 10q22. ', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1487 (2000), 128–134.
- 865 Vermi, W. et al., 'Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas.', *Journal Of Pathology*, 200 (2003), 255-268.
- 866 Vesely, M. , et al., 'Natural innate and adaptive immunity to cancer.', *Annual Review Of Immunology*, 29 (2011), 235–271.
- 867 Vessey, D.A. et al., 'Dimethylsphingosine and FTY720 inhibit the SK1 form but activate the SK2 form of sphingosine kinase from rat heart.', *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 21 (2007), 273–279.
- 868 Vestergaard, M.E., et al., 'Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: a meta-analysis of studies performed in a clinical setting. ', *British Journal Of Dermatology*, 159 (2008), 669-676.
- 869 Vetter, C.S. et al., 'Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma.', *Journal Of Investigative Dermatology*, 118 (2002), 600–605.
- 870 Vignali, D.A.A., et al., 'How regulatory T cells work.', *Nature Reviews Immunology*, 8 (2008), 523–532.

- 871 Villanueva, J., and Herlyn, M., 'Melanoma and the Tumor Microenvironment', *Current Oncology Reports*, 10 (2008), 439-446.
- 872 Visentin, B. et al., 'Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. ', *Cancer Cell*, 9 (2006), 225–238.
- 873 Vivier, E. , et al., 'Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer.', *Nature Reviews Immunology*, 12 (2012), 239-252.
- 874 Voskoboinik, I. , et al., 'Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. ', *Nature Reviews Immunology*, 6 (2006), 940–952.
- 875 Voura, E.B. , et al., 'Involvement of integrin V 3 and cell adhesion molecule L1 in transendothelial migration of melanoma cells.', *Molecular Biology Of The Cell*, 12 (2001), 2699-2710.
- 876 Wagle, N. et al., 'Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. ', *Journal Of Clinical Oncology*, 29 (2011), 3085-3096.
- 877 Waldhauer, I. , and Steinle, A., 'NK cells and cancer immunosurveillance.', *Oncogene*, 27 (2008), 5932-5943.
- 878 Wang, J.D. et al., 'Early induction of apoptosis in androgen-independent prostate cancer cell line by FTY720 requires caspase-3 activation.', *The Prostate*, 40 (1999), 50–55.
- 879 Wang, T. et al., 'BRAF Inhibition Stimulates Melanoma-Associated Macrophages to Drive Tumor Growth. ', *Clinical Cancer Research*, 21 (2015), 1652-1664.
- 880 Wang, T. et al., 'Melanoma-derived conditioned media efficiently induce the differentiation of monocytes to macrophages that display a highly invasive gene signature. ', *Pigment Cell Melanoma Research*, 25 (2012), 493-505.
- 881 Wang, W. , et al., 'Type 1 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor (S1P1) mediation of enhanced IL-4 generation by CD4 T cells from S1P1 transgenic mice. ', *Journal Of Immunology*, 178 (2007), 4885–4890.
- 882 Waterhouse, P. et al. , 'Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctlα-4.', *Science*, 270 (1995), 985-988.
- 883 Webb, M. et al., 'Sphingosine 1-phosphate receptor agonists attenuate relapsing-remitting experimental autoimmune encephalitis in SJL mice. ', *Journal Of Neuroimmunology*, 153 (2004), 108–121.
- 884 Weber, G.F. et al., 'IL-22-mediated tumor growth reduction correlates with inhibition of ERK1/2 and AKT phosphorylation and induction of cell cycle arrest in the G 2-M phase.', *Journal Of Immunology*, 177 (2006), 8266–8272.
- 885 Weber, J.S. et al. , 'A phase 3 randomized, open-label study of nivolumab (anti-PD-1; BMS-936558; ONO-4538) versus investigator's choice chemotherapy (ICC) in patients with advanced melanoma after prior anti-CTLA-4 therapy', *European Society for Medical Oncology Congress (Meeting Abstracts)*, 728 (2014).

- 886 Wehner, R. , et al., 'The bidirectional crosstalk between human dendritic cells and natural killer cells. ', *Journal of Innate Immunity*, 3 (2011), 258–263.
- 887 Wei, E.K., et al., 'Time course of risk factors in cancer etiology and progression.', *Journal Of Clinical Oncology*, 28 (2010), 4052–4057.
- 888 Weigert, A. et al. , 'Apoptotic cells promote macrophage survival by releasing the antiapoptotic mediator sphingosine-1-phosphate. ', *Blood*, 108 (2006), 1635–1642.
- 889 Weigert, A. et al. , 'Sphingosine kinase 2 deficient tumor xenografts show impaired growth and fail to polarize macrophages towards an anti-inflammatory phenotype.', *International Journal Of Cancer*, 125 (2009), 2114–2121.
- 890 Weigert, A. et al. , 'Tumor cell apoptosis polarizes macrophages — role of sphingosine-1-phosphate.', *Molecular Biology Of The Cell*, 18 (2007), 3810-3819
- 891 Wellbrock, C. , and Marais, R. , 'Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. ', *Journal Of Cell Biology*, 170 (2005), 703-708.
- 892 Whyte, C.S. et al., 'Suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 is a key determinant of differential macrophage activation and function. ', *Journal of Leukocyte Biology*, 90 (2011), 845–854.
- 893 Widlund, H.R. et al., 'Beta catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor.', *Journal Of Cell Biology*, 158 (2002), 1079-1087.
- 894 Wilhelm, S. et al. , 'Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer.', *Nature Reviews Drug Discovery*, 5 (2006), 835-844.
- 895 Wilhelm, S. M. et al. , 'BAY 43–9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/ MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis.', *Cancer Research*, 64 (2004), 7099–7109
- 896 Wilke, C.M. et al. , 'Th17 cells in cancer: Help or hindrance?', *Carcinogenesis*, 32 (2011), 643–649.
- 897 Windh, R.T. , et al., 'Differential coupling of the sphingosine 1-phosphate receptors Edg-1, Edg-3, and H218/Edg-5 to the G(i), G(q), and G(12) families of heterotrimeric G proteins.', *Journal Of Biological Chemistry*, 274 (1999), 27351-27358.
- 898 Wing, K. et al. , 'CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function.', *Science*, 322 (2008), 271-275.
- 899 Wojtowicz-Praga, S. et al., 'Modulation of B16 melanoma growth and metastasis by anti-transforming growth factor beta antibody and interleukin-2.', *Journal of immunotherapy with emphasis on tumor immunology*, 19 (1996), 169-175.
- 900 Wolchok, J.D. et al. , 'Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. ', *New England Journal Of Medicine*, 369 (2013), 122-133.
- 901 Wong, S.C. et al. , 'Macrophage polarization to a unique phenotype driven by B cells', *European Journal Of Immunology*, 40 (2010), 2296–2307.

- 902 Wrzesinski, S.H., et al., 'Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy.', *Clinical Cancer Research*, 13 (2007), 5262-5270.
- 903 Wu, H. , et al., 'PTEN signaling pathways in melanoma.', *Oncogene*, 22 (2003), 3113-3122.
- 904 Wu, W. et al., 'VEGF receptor expression and signaling in human bladder tumors.', *Oncogene*, 22 (2003), 3361–3370.
- 905 Wu, Y. et al., 'Neutrophils promote motility of cancer cells via a hyaluronan-mediated TLR4/PI3K activation loop.', *Journal Of Pathology*, 225 (2011), 438-447.
- 906 Wu, Y., et al., 'CCL3-CCR5 axis regulates intratumoral accumulation of leukocytes and fibroblasts and promotes angiogenesis in murine lung metastasis process.', *Journal Of Immunology*, 181 (2008), 6384–6393.
- 907 Wyckoff, J. et al, 'A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors.', *Cancer Research*, 64 (2004), 7022–7029.
- 908 Wyckoff, J.B. et al., 'Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors.', *Cancer Research*, 67 (2007), 2649–2656.
- 909 Xia, P. , and Wadham, C., 'Sphingosine 1-phosphate, a key mediator of the cytokine network: Juxtacrine signaling', *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 22 (2011), 45–53.
- 910 Xia, P. et al., 'An oncogenic role of sphingosine kinase.', *Current Biology*, 10 (2000), 1527-1530.
- 911 Xia, P. et al. , 'Sphingosine kinase interacts with TRAF2 and dissects tumor necrosis factor-alpha signaling.', *Journal Of Biological Chemistry*, 277 (2002), 7996–8003.
- 912 Xia, P. et al. , 'Tumor necrosis factor-alpha induces adhesion molecule expression through the sphingosine kinase pathway.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (1998), 14196-14201.
- 913 Xiang, Y. et al., 'Discovery of novel sphingosine kinase 1 inhibitors.', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19 (2009), 6119–6121.
- 914 Xie, B. et al., 'Blockade of sphingosine-1-phosphate reduces macrophage influx and retinal and choroidal neovascularization. ', *Journal of Cellular Physiology*, 218 (2009), 192–198.
- 915 Xie, P. et al. , 'The crystal structure of BRAF in complex with an organoruthenium inhibitor reveals a mechanism for inhibition of an active form of BRAF kinase. ', *Biochemistry*, 48 (2009), 5187–5198.
- 916 Xin, C. et al. , 'Sphingosine 1-phosphate cross-activates the Smad signaling cascade and mimics transforming growth factor-beta-induced cell responses.', *Journal Of Biological Chemistry*, 279 (2004), 35255–35262.
- 917 Yadav, M. , et al., 'Macrophage's proinflammatory response to a mycobacterial infection is dependent on sphingosine kinase-mediated activation of phosphatidylinositol phospholipase C, protein kinase C, ERK1/2, and phosphatidylinositol 3-kinase. ', *Journal Of Immunology*, 176 (2006), 5494–5503.
- 918 Yamaguchi, Y., et al., 'Contrasting effects of TGF- β 1 and TNF- α on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow.', *Stem Cells*, 15 (1997), 144–153.

- 919 Yamanaka, M. et al., 'Sphingosine kinase 1 (SPHK1) is induced by transforming growth factorbeta and mediates TIMP-1 up-regulation.', *Journal Of Biological Chemistry*, 279 (2004), 53994–54001.
- 920 Yamashita, H. et al. , 'Sphingosine 1-phosphate receptor expression profile in human gastric cancer cells: differential regulation on the migration and proliferation.', *Journal of Surgical Research*, 130 (2006), 80–87
- 921 Yanagisawa, K. et al. , 'Impaired proliferative response of V α 24 NKT cells from cancer patients against α -galactosylceramide.', *Journal Of Immunology*, 168 (2002), 6494–6499.
- 922 Yang, J. et al., 'Tumor-associated macrophages regulate murine breast cancer stem cells through a novel paracrine EGFR/Stat3/Sox-2 signaling pathway.', *Stem Cells*, 31 (2013), 248–258.
- 923 Yang, L. , et al., 'TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression.', *Trends In Immunology*, 31 (2010), 220-227.
- 924 Yang, L. et al., 'IL-21 and TGF- β are required for differentiation of human T_H17 cells.', *Nature*, 454 (2008), 350–352.
- 925 Yang, X.O. et al., 'T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma.', *Immunity*, 28 (2008), 29–39.
- 926 Ye, Q. et al., 'CD137 accurately identifies and enriches for naturally occurring tumor-reactive T cells in tumor.', *Clinical Cancer Research*, 20 (2014), 44-45.
- 927 Yi, L. et al., 'Glioma-initiating cells: A predominant role in microglia/macrophages tropism to glioma.', *Journal Of Neuroimmunology*, 232 (2011), 75–82.
- 928 Yokoo, E. et al. , 'Sphingosine 1-phosphate inhibits migration of RBL-2H3 cells via S1P2: cross-talk between platelets and mast cells.', *Journal Of Biochemistry*, 135 (2004), 673–681.
- 929 Yokoyama, S. et al. , 'A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma.', *Nature*, 480 (2011), 99-103.
- 930 Yonesu, K. et al. , 'Involvement of sphingosine-1-phosphate and S1P1 in angiogenesis: analyses using a new S1P1 antagonist of non-sphingosine-1-phosphate analog. ', *Biochemical Pharmacology*, 77 (2009), 1011-1020.
- 931 Yu, H. , et al., 'STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. ', *Nature Reviews Cancer*, 798-809 (2009).
- 932 Zaynagetdinov, R. et al., 'A critical role for macrophages in promotion of urethane-induced lung carcinogenesis.', *Journal Of Immunology*, 187 (2011), 5703–5711
- 933 Zeisberger, S.M. et al., 'Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach.', *British Journal Of Cancer*, 95 (2006), 272-281.
- 934 Zemann, B. et al. , 'Sphingosine kinase type 2 is essential for lymphopenia induced by the immunomodulatory drug FTY720. ', *Blood*, 107 (2006), 1454–1458.

- 935 Zhang, J.-P. et al., 'Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients.', *Journal of Hepatology*, 50 (2009), 980–989.
- 936 Zhang, J., et al., 'Multiple roles of chemokine (C-C motif) ligand 2 in promoting prostate cancer growth.', *Journal Of The National Cancer Institute*, 102 (2010), 522–528.
- 937 Zhang, X. et al. , 'Gene expression in mature neutrophils: Early responses to inflammatory stimuli. ', *Journal of Leukocyte Biology*, 75 (2004), 358-372.
- 938 Zhang, Z. et al., 'FTY720 ameliorates experimental autoimmune neuritis by inhibition of lymphocyte and monocyte infiltration into peripheral nerves.', *Experimental Neurology*, 210 (2008), 681-690.
- 939 Zheng, Y., and Rudensky, A.Y., 'Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage.', *Nature Immunology*, 8 (2007), 457–462.
- 940 Zhi, L. , et al., 'Sphingosine kinase 1 regulates pro-inflammatory responses triggered by TNFalpha in primary human monocytes.', *Journal of Cellular Physiology*, 208 (2006), 109-115.
- 941 Zhu, X.D. , 'High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma.', *Journal Of Clinical Oncology*, 26 (2008), 2707–2716.
- 942 Zhuang, Y. et al., 'Increased intratumoral IL-22-producing CD4+ T cells and Th22 cells correlate with gastric cancer progression and predict poor patient survival.', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61 (2012), 1965–1975.
- 943 Zitvogel, L. , 'Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. ', *Journal Of Experimental Medicine*, 195 (2002), F9-14.
- 944 Zitvogel, L. , et al., 'Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion', *Nature Reviews Immunology*, 6 (2006), 715-727.
- 945 Zondag, G.C. , et al., 'Sphingosine 1-phosphate signalling through the G-protein-coupled receptor Edg-1.', *Biochemical Journal*, 330 (1998), 605-609.
- 946 Zou, W. , and Chen, L., 'Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment.', *Nature Reviews Immunology*, 8 (2008), 467-477.
- 947 Zou, W., and Restifo, N.P., 'Nine lives for TH9s?', *Nature Medicine*, 18 (2012), 1177-1178.
- 948 Zuo, L. et al. , 'Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma.', *Nature Genetics*, 12 (1996), 97-99.

AUTEUR : Marguerite MRAD

TITRE : Étude des altérations du métabolisme de la sphingosine-1-phosphate dans le mélanome cutané: rôle sur l'infiltration et la polarisation des macrophages associés aux tumeurs.

DIRECTEURS DE THÈSE : Dr. Nathalie ANDRIEU-ABADIE et Pr. Mona DIAB-ASSAF

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Hadath, le 19 Février 2016

RÉSUMÉ :

L'infiltration des mélanomes par les macrophages (TAM) est souvent corrélée à un mauvais pronostic. Cependant, les mécanismes qui régulent le recrutement et la fonction de ces cellules restent encore mal compris. Des études récentes ont montré un rôle majeur de la sphingosine kinase 1 (SK1) tumorale, l'enzyme qui produit la sphingosine-1-phosphate (S1P), dans le remodelage du stroma associé à la tumeur. Le but de ce projet a été d'étudier le rôle de la SK1 tumorale sur le microenvironnement inflammatoire, et en particulier les macrophages, lors du développement des tumeurs mélaniques.

In vitro, nous avons montré que l'inhibition de SK1 dans les cellules de mélanome : 1) bloque la migration des macrophages. A l'inverse, la surexpression de cette kinase dans les cellules tumorales stimule la migration des cellules inflammatoires. Cet effet est dépendant de la S1P et de sa fixation sur les récepteurs S1PR présents à la surface des macrophages ; 2) réduit la sécrétion de TGF- β et 3) stimule la différenciation des macrophages vers un phénotype M1 antitumoral. Ce phénomène n'est pas dépendant de la S1P, ni des S1PRs, mais de la sécrétion de TGF- β par les cellules tumorales. En effet, la différenciation macrophagique peut-être réversée par l'addition de TGF- β recombinant dans le milieu de sécrétion des cellules tumorales.

In vivo, nos résultats montrent que la greffe orthotopique, i.e. intradermique, de cellules de mélanome murin invalidées pour la SK1 à des souris syngéniques C57BL/6 est associée à une réduction de la croissance tumorale, comparée à des souris ayant reçu des cellules de mélanome contrôles. De plus, l'invalidation de la SK1 tumorale conduit à une augmentation significative de l'expression de cytokines anti-tumorales ainsi qu'à une polarisation Th1 au sein de la tumeur. Ce phénomène s'accompagne d'une réduction du pourcentage de macrophages M2 CD206⁺MHCII^{low}, et à l'inverse, d'une augmentation du pourcentage de macrophages M1 CD206⁻MHCII^{high} ainsi que de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ infiltrés dans la tumeur.

Ces résultats suggèrent un rôle clé de la SK1 tumorale dans le recrutement et la polarisation des macrophages dans les mélanomes. Ainsi, l'axe SK1/ TGF- β pourrait constituer une cible thérapeutique prometteuse dans le contrôle de la croissance de cette tumeur.

MOTS CLÉS : inflammation, mélanome, sphingosine 1-phosphate, macrophage, polarisation, TGF- β

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Cancérologie

INTITULÉ DU LABORATOIRE : INSERM UMR 1037 Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse.

Équipe 4 « Sphingolipides, mort cellulaire et progression tumorale »