THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Carine DUFAU

Le 16 décembre 2022

Rôle du métabolisme du céramide dans la dédifférenciation du mélanome induite par le TNF

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **CANCEROLOGIE**

Unité de recherche :
CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Thèse dirigée par
Bruno SEGUI et Nathalie ANDRIEU-ABADIE

Jury

M. Robert BALLOTTI, Rapporteur
Mme Julie CARAMEL, Rapporteure
M. Bruno SÉGUI, Directeur de thèse
Mme Nathalie ANDRIEU-ABADIE, Co-directrice de thèse
M. François PARIS, Président

REMERCIEMENTS

*Je remercie dans un premier temps les membres du jury : **Dr. Ballotti Robert**, **Dr. Caramel Julie** et **Dr. Paris François**. Merci pour le temps que vous avez consacré à l'évaluation de mes travaux de thèse.*

*Un grand merci à mes directeurs de thèse **Pr Ségui Bruno** et **Dr Andrieu-Abadie Nathalie** pour la confiance qu'ils m'ont accordée dans la réalisation de ce projet de thèse. **Nathalie,** je te remercie de m'avoir faite intégrée l'équipe lors de mon M1. Merci de m'avoir initiée au mélanome et aux sphingolipides. Merci également pour tes conseils et tout le temps consacré à la préparation des différents examens, concours ou présentations importantes. **Bruno**, tu as été à la fois mon directeur de thèse et mon chef de service d'enseignement. Merci de m'avoir montrée l'exemple d'un enseignant-chercheur passionné. Merci pour ton soutien lors des moments difficiles dans ce projet qui n'a pas toujours été facile à mener. Tes blagues un peu nulles vont peut-être me manquer un peu.*

Je remercie évidemment toute la team 4 :

- ***Thierry,** merci pour votre disponibilité et vos conseils toujours très pertinents.*
- ***Virginie,** merci pour tout ce que tu m'as appris quand j'étais encore bébé stagiaire puis bébé thésarde. La mémoire du labo qui sait où tout est rangé !*
- ***Joëlle,** ta rigueur scientifique est un exemple à suivre. Merci pour tes conseils et les discussions intéressantes qu'on a pu avoir.*
- ***Stéphane et Patricia,** merci pour toute l'aide technique que vous apportez à l'équipe.*
- ***Laurence,** merci pour tes conseils lors de ma préparation au concours de l'école doctorale, mais également lors de toutes mes récentes présentations.*
- ***Céline,** merci pour ton énergie et tes conseils. Merci pour tous les bonbons et gâteaux apportés au bureau. Merci aussi pour tes encouragements lors des moments importants.*
- ***Elodie,** je pense que sans ton aide le projet ne serait pas là où il en est maintenant. Merci de m'avoir épaulée dans ses derniers mois de thèse. J'ai adoré travaillé en binôme avec toi.*
- ***Stéphanie,** merci pour ton soutien. Tu as toujours été à l'écoute quand j'en avais besoin. Et surtout, merci pour tous les bons plats que tu m'as préparés !*
- ***Anne,** merci pour tout ce que tu m'as apporté au cours de cette thèse. La liste serait trop longue pour l'écrire ici. Merci de m'avoir formée, merci pour les discussions*

autour de mon projet et tes conseils. Merci pour l'énergie que tu as consacré à me remotiver dans les moments difficiles. Tu as toujours été à l'écoute, et j'ai apprécié pouvoir m'appuyer sur toi lors des décisions importantes à prendre. Tu m'as montré qu'avec persévérance on pouvait y arriver.

- ***Matthieu** aka MTT aka Mon Geek. Un grand merci pour tout le temps que tu as consacré aux analyses bio-informatiques de mon projet. Merci pour ton investissement et tes propositions. Tu as été d'une grande aide. Merci également pour les moments de rigolades : tes imitations, tes solos de chant, tes acrobaties, qui ont permis d'alléger le stress des derniers mois de thèse. Merci pour ta gentillesse et tes mots réconfortants.*
- ***Lisa** ma collègue de dédiff et céramidase acide. Ce fût un plaisir d'avoir eu quelqu'un avec qui pouvoir discuter de ces thématiques au quotidien. Ça a été également un plaisir pour moi de te transmettre tout ce que je connaissais à ce sujet. Merci pour l'aide que tu as pu m'apporter sur les manips lorsque j'étais sous l'eau.*
- ***Lorry,** merci pour les discussions sur nos thèses qu'on a pu avoir. Pour les duos de chants sur les chansons Disney ou sur Backstreet Boys. Nous avons vécu ensemble notre première présentation en congrès internationale (Sphingolipid Club forever). J'en garderai un très bon souvenir.*
- ***Mathieu,** le ronchonchon à ma droite. Merci pour ton soutien sans faille tout au long de ma thèse. Mon partenaire en crime sans qui je n'aurai sûrement pas eu le courage d'organiser des soirées d'intégrations. J'ai aimé pouvoir discuter de ma thèse avec toi mais également de livres, films et j'en passe. J'ai trouvé en toi un ami. J'espère qu'on se retrouvera encore souvent autour d'un traditionnel Ricard pour se raconter nos histoires de vie.*
- ***Laura,** merci pour ton énergie et ta bonne humeur. Les heures en culture passaient plus vite grâce à toi. Je ne compte plus le nombre de fous rires qu'on a pu avoir. La chanson des pipettes de 10 restera à tout jamais dans mon cœur.*
- ***Les pioupious : Benjamin,** mon petit stagiaire devenu grand ! Merci pour ton énergie et la motivation que tu as montré dès ton arrivée. J'ai adoré t'encadrer, je suis sûre que tu t'épanouiras en thèse. **Océane** et **Tania,** merci pour votre bonne humeur. Je vous souhaite beaucoup de succès dans vos thèses.*

Je remercie également le « CRCT Crew », collègues devenus amis :

- ***Charly** et **Marie**, les voisins de labo, merci pour les pauses cafés, les soirées sushis/bières lors des longues journées et les astuces de thèse partagées.*

- ***Guillaume,*** *merci pour ton humour décalé, pour ton écoute et le soutien que tu as pu m'apporter.*
- ***Lorraine,*** *merci pour ta bonne humeur, pour tous les bons moments passer autour d'un verre, et ton esprit d'aventure qui a pu nous sortir de la routine.*
- ***Claire****, je ne peux pas tout écrire ici. Merci d'avoir été là tout simplement. Merci pour ton soutien que ce soit au labo ou dans ma vie personnelle. Cette thèse aurait été plus difficile sans toi je pense. J'ai trouvé en toi une véritable amie sur qui je peux compter.*

Je remercie mes amis de la Fac qui m'ont accompagnée tout au long de ce parcours :

- ***Julien,*** *merci pour tous les encouragements que tu as pu me donner.*
- ***Morgane****, tu m'as accompagnée dans mon parcours depuis la première année de licence. Il y a trop de souvenirs pour les lister. Nos rendez-vous à notre QG pour boire « qu'une bière » vont me manquer. Merci d'être une amie toujours présente.*
- ***Sébastien, Pauline et Emma****, le trio infernal. Je vous imagine ne lire que ce paragraphe. Je pense que je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous m'apportez au quotidien. Merci d'avoir supporté mes complaintes tout au long de cette thèse. Merci pour les fous rires, les voyages inoubliables, les week-ends chillou et les Facetime qui remontent le moral. Vous êtes des amis en or. Je vous aime fort.*
  (Spécial dédicace à Pauline qui a eu le courage de corriger l'orthographe de 60 pages d'introduction)

Merci à mes amis du Pays-Basque, ***Julie****,* ***Peio*** *et* ***Mikaël.*** *Merci pour tous les bons moments passés ensemble depuis qu'on se connait. La vie nous a séparé géographiquement mais rien ne change quand on se retrouve.*

Pour terminer, je remercie ma famille sans qui je ne serai pas là aujourd'hui. Vous m'avez toujours soutenu dans mes choix. Merci d'avoir toujours su m'encourager dans les moments de doutes. Merci d'avoir cru en mes capacités quand même moi je n'y croyais pas. Grâce à vous j'ai réalisé mon rêve d'enfant de devenir chercheure. Je vous aime.

Amatxi, milesker anitz zure laguntzagatik. Maite zaitut.

« Nous devons avoir de la persévérance et surtout de la confiance en nous-même »

Marie Curie

RÉSUMÉ

Le mélanome cutané est un cancer de la peau agressif de par, notamment, son fort potentiel métastatique. L'utilisation des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (ICI), anti-PD-1 et anti-CTLA-4, a révolutionné la prise en charge des patients atteints de mélanome avancé. Cependant, la moitié de ces patients ne répond pas aux traitements ou rechute. Notre équipe a récemment mis en évidence que le TNF, une cytokine pro-inflammatoire produite par les cellules immunitaires, participe à la mise en place de ces résistances. En effet, l'utilisation d'anticorps ciblant le TNF améliore considérablement l'efficacité des anti-PD-1 dans un modèle murin de mélanome. Dans un contexte d'immunothérapie, le TNF peut induire la mort suite à l'activation (AICD) des lymphocytes T cytotoxiques ainsi que l'expression de points de contrôle immunitaire secondaire tel que Tim-3. De plus, le TNF peut également agir directement sur les cellules de mélanome, et entrainer leur dédifférenciation. Ce mécanisme très semblable à la transition épithélio-mesenchymateuse, se marque par la diminution du facteur de transcription MITF et de l'expression des antigènes mélanocytaires.

Parallèlement, le TNF est un modulateur du métabolisme du céramide. Or, notre laboratoire a également mis en évidence que des perturbations de ce métabolisme impactent la résistance aux immunothérapies. En effet, l'inhibition de la sphingosine kinase 1, responsable de la production de S1P, ou encore la surexpression de la sphingomyélinase neutre 2, favorisant la production de céramide, améliore l'efficacité des anti-PD-1 et anti-CTLA-4 dans des modèles murins de mélanome. De plus, des études récentes suggèrent un rôle du métabolisme du céramide dans la dédifférenciation du mélanome.

Au vu de l'étroite relation entre le TNF et le métabolisme du céramide, ainsi que leur rôle respectif dans la mise en place de résistance aux ICI, l'objectif général de ma thèse consistait donc à étudier le rôle du métabolisme du céramide dans la dédifférenciation du mélanome induite par le TNF.

Dans un premier temps, nous avons observé que la dédifférenciation du mélanome induite par le TNF est associée à une augmentation globale de la biosynthèse des sphingolipides. Plus spécifiquement, le TNF diminue l'expression et l'activité de la céramidase acide, enzyme centrale de la dégradation du céramide. De manière intéressante, l'étude rétrospective de cohortes de patients atteints de mélanome avancé traités par anti-PD-1, met en évidence une expression de la céramidase acide diminuée dans les tumeurs classées comme

transitoires ou dédifférenciées. En ce sens, nous montrons que la diminution de la céramidase acide par une stratégie de siARN, induit par elle-même la dédifférenciation du mélanome vers un état transitoire. A l'inverse, la surexpression de la céramidase acide dans une lignée de mélanome ayant un phénotype transitoire augmente l'état de différenciation et atténue la dédifférenciation du mélanome induite par le TNF. La diminution de la céramidase acide participe donc au phénomène de dédifférenciation induit par le TNF. De façon plus globale, nous montrons que le TNF induit l'accumulation de divers métabolites, dont les lactosylcéramides. Alors que le céramide et la sphingosine exogène déclenchent la dédifférenciation des cellules de mélanome, l'inhibition de la synthèse du céramide et des glycosphingolipides entrave la dédifférenciation des cellules de mélanome induite par le TNF. L'analyse du contenu plasmatique en sphingolipides chez les patients atteints de mélanome avancé indique que les lactosylcéramides sont enrichis chez les non-répondeurs à l'immunothérapie.

Ainsi, cette thèse montre que les changements du métabolisme du céramide sont impliqués dans la dédifférenciation des cellules de mélanome induite par le TNF et pourraient participer à la résistance aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire.

SUMMARY

Cutaneous melanoma is an aggressive skin cancer with a high metastatic potential. The use of immune checkpoint inhibitors (ICI), targeting PD-1 and CTLA-4, has revolutionized the management of patients with advanced melanoma. However, half of these patients do not respond to treatment or relapse. Our team has recently demonstrated that TNF, a pro-inflammatory cytokine produced by immune cells, is involved in the development of this resistance. Indeed, the use of antibodies targeting TNF significantly improves the efficacy of anti-PD-1 in a mouse model of melanoma. In the context of immunotherapy, TNF can lead to the activation-induced cell death (AICD) of cytotoxic T cells and the expression of secondary immune checkpoints such as Tim-3. In addition, TNF can also directly act on melanoma cells, leading to their dedifferentiation. This mechanism is very similar to the epithelial to mesenchymal transition and is marked by a decreased expression of the transcription factor MITF and of melanocytic antigens.

In parallel, TNF is a modulator of ceramide metabolism. Our laboratory has also demonstrated that alterations of this metabolism have an impact on the resistance to immunotherapies. Indeed, inhibition of sphingosine kinase 1, responsible for S1P production, or overexpression of neutral sphingomyelinase 2, which promotes ceramide production, improves the efficacy of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 in murine melanoma models. In addition, recent studies suggest a role for the ceramide metabolism in melanoma dedifferentiation.

Given the close relationship between TNF and the ceramide metabolism, as well as their respective roles in the development of ICI resistance, the general objective of my PhDs was to investigate the role of ceramide metabolism in TNF-induced melanoma dedifferentiation.

First, we observed that TNF-induced melanoma dedifferentiation is associated with an overall increase in sphingolipid biosynthesis. More specifically, TNF decreases the expression and activity of acid ceramidase, a central enzyme able to catalyse ceramide degradation. Interestingly, a retrospective study on tumours from 3 cohorts of advanced melanoma patients treated with anti-PD-1, shows a reduces expression of acid ceramidase in tumours classified as transitory or dedifferentiated. In accordance, we show that the decrease of acid ceramidase by a siRNA induces, on its own, the dedifferentiation of melanoma cells towards a more transitory state. Conversely, overexpression of acid ceramidase in a melanoma cell line with a transitory phenotype increases the differentiation state and attenuates TNF-induced melanoma dedifferentiation. The decrease of acid ceramidase thus participates in the TNF-induced dedifferentiation phenomenon. More globally, we show that TNF induces the accumulation of various/a number of metabolites, including lactosylceramides. While exogenous ceramide and sphingosine trigger melanoma cell dedifferentiation, inhibition of ceramide and glycosphingolipid synthesis impedes TNF-induced melanoma cell dedifferentiation. Analysis of plasma sphingolipid content in advanced melanoma patients indicates that lactosylceramides are enriched in non-responders to immunotherapy.

Thus, our work shows that changes in ceramide metabolism are involved in the TNF-induced dedifferentiation of melanoma cells and may participate in the resistance to immune checkpoint inhibitors.

SOMMAIRE

RÉSUMÉ 1

SUMMARY 3

SOMMAIRE 4

LISTE DES ABBRÉVIATIONS 7

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX 10

INTRODUCTION 11

CHAPITRE 1 : LE MÉLANOME CUTANÉ 12

1) Epidémiologie 12

a. Incidence, mortalité et survie 12
b. Facteurs de risque 13

2) Physiopathologie 15

a. Développement du mélanome 15
b. Diagnostique 19
c. Classification 20
d. Traitements 21

3) La dédifférenciation des cellules de mélanome 24

a. Le modèle du switch phénotypique 25
b. Les facteurs induisant la dédifférenciation des cellules de mélanome 26
c. Rôle de la dédifférenciation des cellules de mélanome dans la résistance aux traitements 27

CHAPITRE 2 : LE MÉTABOLISME DU CÉRAMIDE 33

1) Structure 33

2) Métabolisme 34

a. Anabolisme du céramide 34
b. Biosynthèse des sphingolipides complexes 37
c. Catabolisme du céramide 41
d. Altération du métabolisme des sphingolipides chez l'Homme 41

3) Le Céramide au cœur de la signalisation cellulaire 42

a. Céramide et apoptose 42
b. Céramide et cycle cellulaire 43
c. Céramide et autophagie 44

4) Dérégulation du métabolisme du céramide et mélanome 44
a. Modification de l'expression des enzymes du métabolisme du céramide 44
b. Rôle du métabolisme du céramide dans la survie et la prolifération du mélanome 46
c. Impact du métabolisme du céramide sur l'agressivité du mélanome 48
d. Métabolisme du céramide et dédifférenciation du mélanome 50
CHAPITRE 3 : LE FACTEUR DE NÉCROSE TUMORALE OU TNFα 52
1) Structure, Signalisation et Fonctions Physiologiques 52
a. Structure 52
b. Signalisation du TNF 52
c. Fonctions Physio(patho)logiques 56
2) TNF et cancer 58
a. Rôle anti-tumoral du TNF 59
b. Rôle pro-tumoral du TNF 62
3) TNF et sphingolipides dans le cancer 67
OBJECTIFS DE LA THÈSE 71
MATÉRIELS ET MÉTHODE 73
1) Culture cellulaire 74
2) Traitements 74
3) RNA-Seq 74
4) Signatures de l'état de différenciation à partir des données RNA Seq : 75
5) Activités des facteurs de transcription : 75
6) RNA-Seq sur données publiques : 76
7) Visualisation des données 76
8) qPCR 76
9) Cytométrie en flux 76
10) Simple western 77
11) Western Blot 77
12) Dosage de la céramidase acide 78
13) Dosage des sphingolipides dans les cellules : 78
14) Dosage des sphingolipides dans le plasma des patients : 78

15) Analyses Statistiques : 78
RÉSULTATS 79
CONCLUSION GÉNÉRALE 108
DISCUSSION GÉNÉRALE 110
La dédifférenciation du mélanome induit par le TNF est associée à une production de sphingolipides..... 111
La céramidase acide participe à la dédifférenciation induite par le TNF..... 112
La glucosylcéramide synthase, une cible thérapeutique potentielle dans le mélanome..... 117
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 120
LISTE DES PUBLICATIONS..... 141
ANNEXES 142

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

AC: Céramidase acide
acSMase: Sphingomyélinase alcaline
ACT: Transfert adoptif de lymphocytes T
ADN: Acide désoxyribonucléique
AICD: Activation-induced cell death
AJCC: American Joint Committee on Cancer
AKT: Protéine kinase B
AP1: Activator protein 1
aSMase: Sphingomyélinase acide
ATF4: Activating transcription factor 4
ATP: Adénosine triphosphate
BAD: BCL2 associated agonist of cell death
Bax: BCL2 associated X protein
Beclin-1: Bécline 1
Breg : Lymphocyte B régulateur
C1P: Céramide 1-Phosphate
CCL2: Chemokine ligand 2
Cdases : Céramidases
CERK: Céramide kinase
CerS: Céramide synthase
CERT: Ceramide transfer protein
cFLIP: FLICE-like inhibitory protein
CGT: Céramide galactosltransférase
CHIP-Seq: Séquençage CHIP
cIAP1/2: Cellular inhibitor of apoptosis protein-1
CMH-I: Complexe d'histocompatibilité de type I
COPII: Coat protein complex II
COX-2: Cyclooxygénase 2
CPE: Céramide phosphate-éthanolamine
CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CST: Cérébroside sulfotransférase
CTL: Lymphocyte T cytotoxique
CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DAG: Diacylglycérol
DES: Désaturase
dhCer: Dihydrocéramide
EGFR: Epidermal growth factor receptor
EMT: Epithelial to mesenchymal transition
ERK: Extracellular signal-regulated kinases
FADD: Fas-Associated protein with Death Domain
FAK: Focal adhesion kinase
FAN: Factor associated with neutral sphingomyelinase activation
GalCer: Galactosylcéramidase

GBA: Glucosylcéramidase
GCS: Glycosylcéramide synthase
GlcCer: Glucosylcéramide
glycoSL: Glycosphingolipide
GM2A : GM2 Ganglioside Activator
ICI: Inhibiteurs de points de contrôle immunitaire
IFNα : Interferon α
IGF1R: Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor
I-kB: Inhibitor of nuclear factor kappa B
IKK: IkappaB kinase
IL-1β: Interleukine 1β
IL2: Interleukine 2
IL6: Interleukine 6
ILP: Isolated Limb Perfusion
IPRES: Innate anti-PD-1 Resistance
JNK: c-Jun N-terminal kinases
KDSR: 3-céto-dihydro-sphingosine réductase
KO: Knock Out
Ksa: 3-Céto-sphinganine
LacCer: Lactosylcéramide
LPP1-3: Lipide phosphate phosphatase
LPS: Lipopolysaccharides
LT: Lymphocyte T
LUBAC: Linear ubiquitin chain assembly complex
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MC1R: Récepteur de la mélanocortine de type 1
MCR: Microscopie confocale par réflectance
MDSC: Myeloid-derived suppressor cell
MLKL: Mixed-lineage kinase domain-like protein
MMP2: Matrix metalloproteinase-2
NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NCSC: Neural Crest Stem Cell
NEMO: NF-kB Essential Modulator
NF-kB: Nuclear factor-kappa B
NGFR: Nerve Growth Factor Receptor
NK: Natural Killer
NSD: neutral sphingomyelinase domain
nSMase: Sphingomyélinase neutre
OMS: Organisation Mondial de la Santé
PARP: poly(ADP-ribose) polymérase
PAX3: Paired Box 3
PD-1: Programmed cell death protein 1
PDGFR: Platelet-derived growth factor receptor
PD-L1: Programmed death-ligand 1
PDMP: 1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol
PDX: Patient Derived Xenograft
PE: Phosphoéthanolamine

PGE2: Prostaglandine E2
PI3K: Phosphatidylinositol 3 kinase
PI4P: Phosphatidylinositol-4-phosphate
PKC: Phosphokinase C
PP2A: Protéine Phosphatase 2A
RE: Réticulum endoplasmique
RGP: Radial growth phase
RIPK1: Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
RNA-Seq: Séquençage de l'ARN
ROS: reactice oxygen species
RTK: récepteur tyrosine kinase
RXR: récepteur X des rétinoides
S1P: Sphingosine 1 Phosphate
S1PPase: Sphingosine 1 Phosphate Phosphatase
S1PR: Sphingosine 1 Phosphate Receptor
Sa: Sphinganine
SAP: protéines activatrices de sphingolipides
SCD: stéaroyl-CoA désaturase
shARN: short hairping ARN
siARN: small interfering ARN
SK1: Sphingosine kinase 1
SK2: Sphingosine kinase 2
SL: Sphingolipide
SM: Sphingomyéline
SMAC: second mitochondria-derived activator caspase
Smase: Sphingomyélinase
SMC: Starved melanoma cell
SMS: Sphingomyéline Synthase
So: Sphingosine
SODD: Silencer Of Death Domain
SPL: Sphingosine 1 Phosphate Lyase
Spns2: Spinster 2
SPT: Sérine Palmitoyl Transférase
TACE: TNFα-converting enzyme
TAK1: TGFβ-Activated protein 1
TAV: Tumor associated vessel
TCGA: The Cancer Genome Atlas
TF: Transcription Factor
Th1: T helper 1
TIL: Lymphocyte infiltrant la tumeur
TLR-9: Toll Like receptor-9
TNF: Tumor Necrosis Factor
TNF-R: Tumor Necrosis Factor Receptor
TRADD: TNF-R1-associated death domain
TRAF2: TNFR-associated factor 2
Treg: Lymphocyte T régulateur
uPA: Urokinase
UV : Ultra-violet

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Incidence et mortalité du mélanome au niveau mondial en 2020 12
Figure 2. Incidence et mortalité du mélanome en France 13
Figure 3. Développement linéaire du mélanome à partir d'un nævus 15
Figure 4. Altérations génétiques observables dans le mélanome 16
Figure 5. Les principales voies de signalisations altérées dans le mélanome 19
Figure 6. Classification TNM du mélanome selon l'AJCC (8ème édition) 20
Figure 7. Recommandations pour la prise en charge du mélanome en 2022 21
Figure 8. Modèle de la dédifférenciation des cellules de mélanome 26
Figure 9. Modèle de la dédifférenciation des cellules de mélanome dans la résistance aux traitements 29
Figure 10. Structure des principaux sphingolipides 34
Figure 11. Principales voies de production de céramide 34
Figure 12. Métabolisme du céramide 37
Figure 13. Schéma de la synthèse des gangliosides 40
Figure 14. Dérégulations du métabolisme des SLs dans le mélanome 46
Figure 15. Signalisation du TNF-R1 55
Figure 16. Rôle du TNF dans le cancer 59

Tableau 1. Les principaux RTKs participant à la dédifférenciation du mélanome 30
Tableau 2. Une déficience dans la signalisation TNF sensibilise à l'infection par divers pathogènes. 57

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : LE MÉLANOME CUTANÉ

1) Epidémiologie

a. Incidence, mortalité et survie

En 2020, l'organisation mondiale de la santé rapporte 324 635 nouveaux cas de mélanome dans le monde. Il ne représente que 2% de l'ensemble des cancers cependant c'est le cancer de la peau le plus mortel. Son incidence ne cesse d'augmenter chaque année (+ 27.5% d'ici 10 ans) avec un taux plus élevé en Australie, Amérique du Nord et Europe de l'Ouest. Cette observation peut s'expliquer par un risque relatif plus élevé des populations à peau claire de développer un mélanome suite à une exposition au soleil [1] mais également par un changement de style de vie post seconde guerre mondiale avec une augmentation des comportements à risque (vacances au soleil, activités en plein air, bronzage) [2]. Bien que l'incidence augmente, le taux de mortalité semble se stabiliser depuis quelques années, voire diminuer dans certains pays. Ceci peut s'expliquer par la mise en place d'importantes campagnes de prévention mais également le développement ces 15 dernières années de thérapies ciblées efficaces.

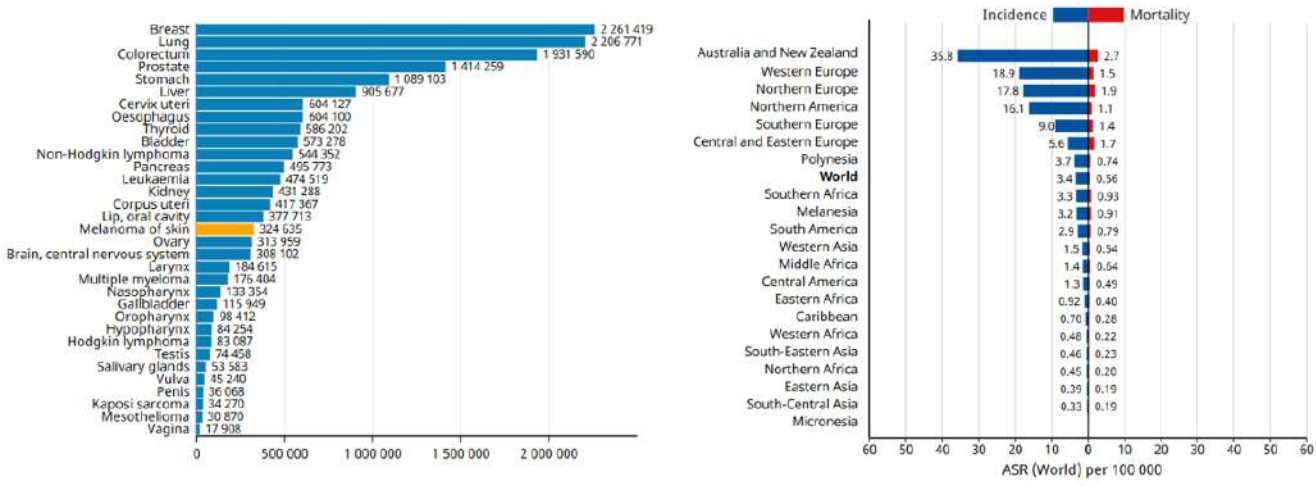


Figure 1. Incidence et mortalité du mélanome au niveau mondial en 2020. L'incidence du mélanome ne cesse d'augmenter au niveau mondial. En 2020, environ 325 000 nouveaux cas ont été estimés par l'OMS.

En France, les données suivent la tendance mondiale puisque l'incidence de ce cancer a doublé chez les femmes et triplé chez les hommes entre 1988 et 2012. L'âge médian de diagnostic est de 60 ans pour les femmes et 66 ans pour les hommes, avec un taux de survie nette standardisée à 5 ans de 91%. (Données de l'Institut National du Cancer) De la même

manière qu'au niveau mondial le taux de mortalité semble se stabiliser depuis le début des années 2000.

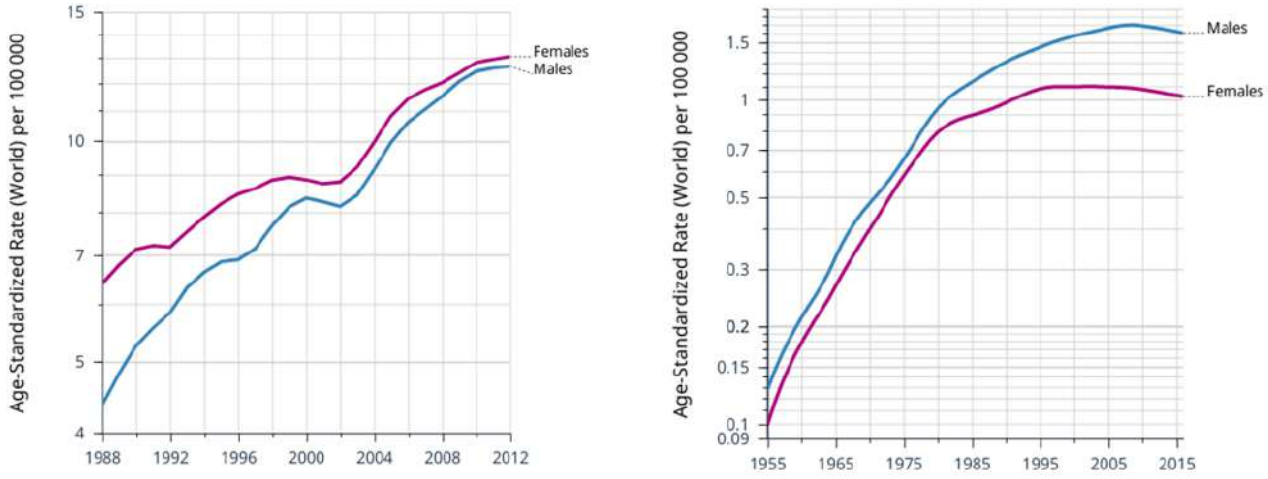


Figure 2. Incidence et mortalité du mélanome en France. Tandis que l'incidence du mélanome a augmenté entre 1988 et 2012 en France chez les hommes et les femmes, la mortalité semble se stabiliser depuis quelques années. (Source OMS)

b. Facteurs de risque

Le mélanome est un cancer multifactoriel dont le risque dépend de l'association de facteurs intrinsèques et extrinsèques.

i. Facteurs intrinsèques

Bien que les mélanomes dérivant d'un nævus (grain de beauté) préexistant ne sont pas les plus fréquents, une méta-analyse démontre que les individus présentant un nombre de nævi supérieur à 100 présentent un risque 7 fois plus élevé de développer un mélanome. De la même manière, la présence de nævi atypiques possédant des formes irrégulières et asymétriques constitue un risque supplémentaire [3]. Les caractéristiques phénotypiques rentrent aussi en jeu, puisque les personnes à peau, cheveux et yeux clairs présentent un risque plus important de développer un mélanome [4]**.** Enfin, les antécédents familiaux sont également à prendre en compte. Les personnes ayant un parent au premier degré atteint de mélanome possèdent un risque deux fois plus élevé d'être atteintes elles-mêmes [5]**.** L'effet des antécédents familiaux sur le risque de mélanome semble être indépendant de l'âge, du nombre de nævi, de la couleur des cheveux et des yeux, et des taches de rousseur. De façon similaire, un individu développant un mélanome dans sa vie, a un risque plus élevé de développer à nouveau un mélanome ou un carcinome cutané [6]**.** Les formes familiales du mélanome représentent environ 10% des

mélanomes, et diffèrent des mélanomes sporadiques au niveau clinique et histologique [7]. En effet, ces formes se caractérisent par des lésions primaires multiples et plus fines, un âge plus jeune au premier diagnostic et une meilleure survie. Le développement de mélanome familial est souvent associé à des prédispositions génétiques. Des mutations dans le gène *CDKN2A* sont retrouvés dans 40% des mélanomes familiaux [8,9]**.** De façon plus rare des mutations dans d'autres gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire ou les réparations des dommages à l'ADN tels que *CDK4* ou *BAP1* peuvent également être retrouvées [10,11]**.** Des variations génétiques de plus faible pénétrance existent aussi dans les formes sporadiques du mélanome. En effet, certains gènes participant à la pigmentation présentent de forts polymorphismes génétiques dont certains variants augmentent la susceptibilité de développer un mélanome [12]**.** L'exemple le plus flagrant est celui du gène codant pour le récepteur à la mélanocortine 1 (*MC1R*) dont certains variants sont associés à la fois au phénotype (cheveux roux, peau clair) et à la susceptibilité de développer un mélanome [13]**.** En fonction de la combinaison des variants de *MC1R* et des variants des gènes de la pigmentation, les mélanocytes produisent différents niveaux d'eumélanine brun foncé, hautement protectrice contre les UV ou de phéomélanine jaune-rouge moins protectrice, modulant ainsi la susceptibilité individuelle de former un mélanome suite à une exposition aux UV.

ii. Facteurs extrinsèques

L'exposition aux UV naturels ou artificiels est effectivement le facteur de risque environnemental principal du mélanome. En 1993, Armstrong and Kricker estime que 65% des mélanomes sont causalement dus à une exposition au soleil [14]**.** Une méta-analyse sur 57 études démontre que ce n'est pas une exposition chronique mais une exposition intermittente intense au soleil ou encore la quantité de coup de soleil au cours d'une vie, qui augmente d'un facteur 2 le risque de développer un mélanome [15]**.** L'exposition plus particulièrement durant l'enfance semble être cruciale dans la susceptibilité à déclencher la maladie à l'âge adulte [14]**.** De plus, de façon similaire, l'utilisation de lit de bronzage avant l'âge de 35 ans augmente également d'un facteur 2 le risque de développer un mélanome reliant ainsi directement les UV à la formation de mélanome [16]**.** L'exposition intense aux UV induit des cassures à l'ADN tels que des transitions G>T (induites par les UVA) et C>T (induites par les UVB), conduisant à de multiples mutations observées dans le mélanome. Le mélanome est en réalité l'un des cancers possédant la plus forte charge mutationnelle, avec environ 14,4 mutations par mégabase [17].

2) Physiopathologie

a. Développement du mélanome

La transformation des mélanocytes en mélanome métastatique est le résultat, comme dans la plupart des cancers, de l'apparition d'évènements génétiques séquentiels aboutissant à l'activation de voies oncogéniques et l'inactivation des gènes suppresseur de tumeur. Il existe un modèle de progression linéaire décrivant la mélanomagenèse (Modèle de Clark). Sous l'action des UV, des mutations activatrices apparaissent dans la voie des MAPKs, souvent une mutation de *BRAF* (48%) ou de *NRAS* (28%), entraînant ainsi une prolifération excessive des mélanocytes et la formation de nævi bénins ou dysplasiques. Par la suite, l'accumulation de mutations somatiques, souvent la perte de *PTEN* (8%) ou *CDKN2A* (15%), entraîne la croissance radiale des cellules (stade RGP). Les cellules ont encore à ce stade un faible potentiel invasif et restent confinées dans l'épiderme. L'acquisition de propriétés mésenchymateuses, comme le switch des cadhérines CDH1/CDH2, ainsi que des mutations supplémentaires, notamment au niveau de TP53 (16%), permettent à ces cellules d'acquérir la capacité à envahir le derme (phase de croissance verticale : VGP) et de métastaser. (Figure 3)

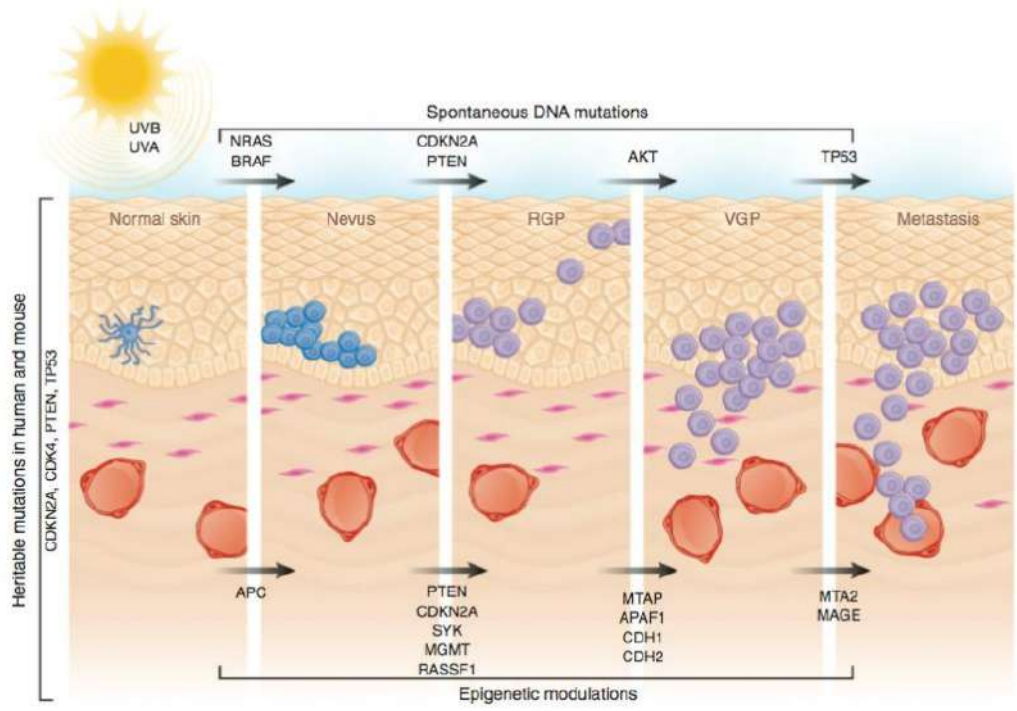


Figure 3. **Développement linéaire du mélanome à partir d'un nævus [18]**.

Il est bon de préciser que tous les mélanomes ne dérivent pas d'un nævus préexistant mais peuvent apparaître *de novo*. En effet, une étude analysant 16 162 cas démontre que seulement 30% des mélanomes sont histologiquement associés à un nævus [19]**.**

En réalité, la forte charge mutationnelle du mélanome rend difficile la caractérisation des profils génétiques responsables de la mélanomagenèse. Cependant, grâce aux avancées des techniques de séquençage, différentes altérations affectant l'expression d'un grand nombre de gènes, telles que des mutations, des délétions, des amplifications ou des polymorphismes, ont été révélées (Figure 4).

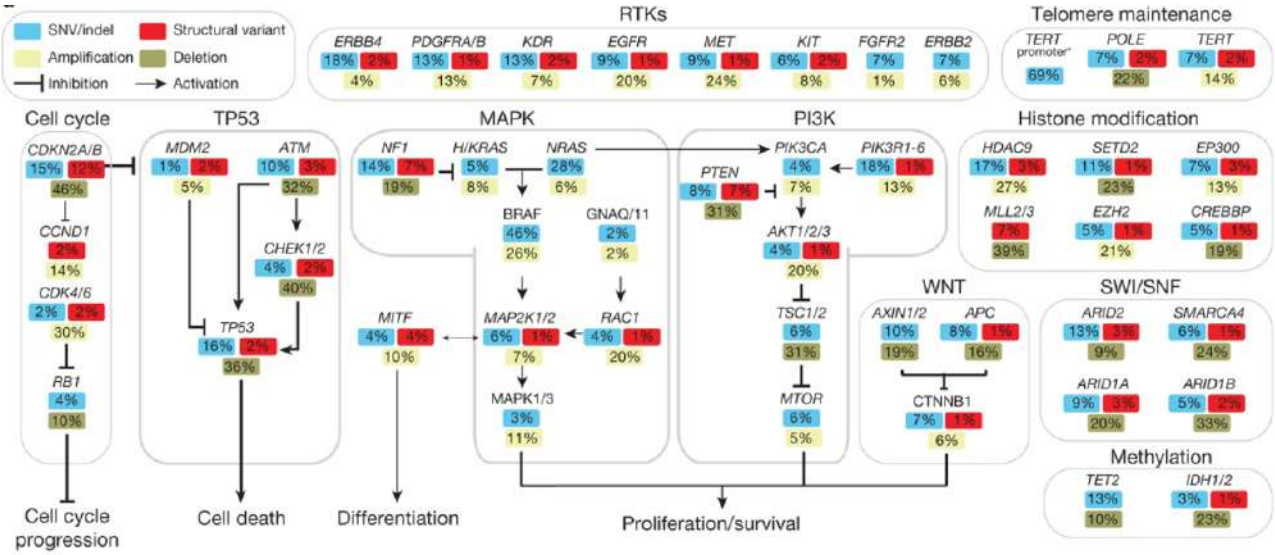


Figure 4. Altérations génétiques observables dans le mélanome [20].

Malgré cette grande diversité mutationnelle, le mélanome peut être classé en différent sous-types moléculaires caractérisés par des mutations principales spécifiques. Le projet TCGA (The Cancer Genome Atlas), basé sur le séquençage de l'intégralité de l'exome (WES, whole exome sequencing) d'échantillons tumoraux de 318 patients atteints de mélanome, décrit 4 sous-types : BRAF, RAS, NF1 et triple négatif. Ce dernier est un groupe hétérogène caractérisé par l'absence de mutations « hotspots » des gènes *BRAF*, *RAS*, et *NF1* [21]. Cependant, l'étendue des altérations génétiques possible montre clairement que, même à l'intérieur de ces 4 sous-types, de nombreux autres gènes sont mutés de manière récurrente. Les altérations secondaires les plus fréquentes sont associées à la perte de *CDKN2A* ou de *PTEN*, des mutations de *TP53* ou des amplifications de divers gènes tels que *TERT* ou *MITF* [21].

i. <u>*Les principales mutations initiatrices*</u>

Les mutations BRAF : *BRAF* est muté dans environ 50% des mélanomes. (Figure 4) La mutation, la plus fréquente, présente dans 90% des cas, est la mutation entraînant la substitution de la valine par un acide glutamique en position 600 ($BRAF^{V600E}$). La protéine kinase BRAF fait partie de la voie des MAPK, ainsi ses mutations entraînent l'activation constitutive de cette voie et participe à la prolifération et la survie des cellules tumorales. Des mutations de *BRAF* sont également trouvées dans les nævi et sont considérées comme un évènement initiateur de

la transformation des mélanocytes [22]**.** Cependant, il a été démontré qu'une mutation de *BRAF* est nécessaire mais pas suffisante pour développer un mélanome [23]**.** En effet, les cellules acquièrent d'autres altérations génétiques, affectant notamment *TP53*, *CDKN2A* ou *PTEN*, qui conduisent à la transformation tumorale [24]**.**

Les mutations RAS : Il existe 3 isoformes de la protéine RAS : HRAS, KRAS, et NRAS. Dans le mélanome, l'isoforme NRAS est le plus fréquemment mutée (27,6% des cas) [25]. (Figure 4) Comme BRAF, les mutations affectant NRAS arrivent très tôt dans la mélanomagenèse. La GTPase NRAS mutée, active de manière constitutive la voie MAPK mais également la voie PI3K/AKT. A noter que les mutations BRAF et NRAS sont mutuellement exclusives, probablement de par leur effet redondant sur la voie des MAPK [26]**.**

Les mutations NF1 : *NF1* est un gène suppresseur de tumeur codant pour une GTPase qui régule négativement NRAS. Il est muté dans environ 14% des mélanomes. Sa perte de fonction représente une façon alternative d'activer la voie MAPK [27] et est, de ce fait, fortement associée à la résistance aux inhibiteurs de BRAF et MEK [28].

ii. <u>Les mutations secondaires les plus fréquentes</u>

Les mutations du promoteur de TERT : Des mutations au niveau du promoteur du gène *TERT* sont retrouvées dans environ 70% des cas de mélanome [29]**.**(Figure 4) La réactivation de TERT dans les cellules cancéreuses leur confère un potentiel de prolifération illimité en stabilisant la longueur de télomères au cours de la division cellulaire. C'est une des altérations secondaires qui arrivent le plus tôt [30], et qui coopère avec les mutations de la voie des MAPK dans la progression tumorale [31].

Les mutations CDKN2A : Les mutations de *CDKN2A* sont très fréquentes dans les mélanomes familiaux mais peuvent également se retrouver dans les mélanomes sporadiques. Ce gène code pour deux protéines suppresseurs de tumeurs : $p16^{INK4A}$ et $p14^{ARF}$. De par son rôle inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines, CDK4 et CDK6, $p16^{INK4A}$ régule négativement le cycle cellulaire. La protéine $p14^{ARF}$ participe également au blocage du cycle cellulaire en interférant avec MDM2, un régulateur négatif de p53 [32]**.** Quand *CDKN2A* est inactivé par des mutations (13,6% des cas) ou par des délétions (41,4% des cas), une dérégulation du cycle se produit, ce qui favorise la progression du mélanome. (Figure 4) Ces altérations sont absentes dans les nævi et apparaissent dans les tumeurs primaires [30]**.**

Les mutations de PTEN : Ces altérations secondaires sont fréquemment retrouvées dans le mélanome. Dans des conditions physiologiques, PTEN est un répresseur de la voie PI3K/AKT.

Une perte de fonction de PTEN active de façon constitutive la voie AKT, favorise la survie des cellules tumorales et participe également aux processus de migration cellulaire [33]**.** Il est intéressant de noter que les mutations de NRAS et la perte de PTEN ont un effet redondant sur l'activation de la voie PI3K, ce qui peut expliquer la plus forte prévalence de cette mutation dans les mélanomes mutés sur *BRAF* comparés aux mélanomes mutés sur *NRAS* [21]. De plus, il est décrit que la perte de PTEN participe à la résistance aux inhibiteurs de BRAF des mélanomes BRAF mutés [34]**.** Malgré des premières études identifiant un rôle important de PTEN dans la phase RGP (Figure 3), il semblerait que ces altérations apparaissent plutôt dans les formes invasives du mélanome [30]**.**

Les mutations TP53 : Des mutations dans le gène *TP53* sont retrouvées dans 16% des mélanomes [25]. La protéine p53 est un senseur des dommages à l'ADN, son activation inhibe le cycle cellulaire et active l'apoptose. Les mutations de *TP53* rendent les mélanocytes plus susceptibles aux UV et favorisent l'apparition de mélanomes en présence de la mutation $BRAF^{V600E}$ [35]. A l'inverse, une réactivation de p53, par la molécule PRIMA-1^{Met}/APR-246, permet de sensibiliser des cellules de mélanome aux thérapies ciblant la protéine BRAF [36]. Les mutations de *TP53* ont lieu tardivement au cours du développement du mélanome, et participe très certainement au processus métastatique [30]**.** En supplément des mutations directes, la perte de p53 peut également être due à l'inactivation de *CDKN2A*. En effet, la perte de $p14^{ARF}$, permet à l'ubiquitine E3-ligase MDM2 de se lier à p53 et d'induire sa dégradation *via* le protéasome. Une amplification de MDM2 et MDM4 peut également être observée chez une grande proportion de mélanomes [37].

Dans son ensemble, toutes ces altérations coopèrent entre elles de manière récurrente dans des signalisations communes (Figure 5). Le TCGA a intégré toutes les données relatives aux mutations, au nombre de copies et à la méthylation afin d'identifier les voies de signalisation les plus impactées dans le mélanome. Comme attendu, 91% des mélanomes ont une altération des voies de survie MAPK/AKT, 69% sont altérés pour les voies régulant le cycle cellulaire RB1/CDKN2A et enfin 19% sont affectés pour la voie MDM2/p53 [21].

Malgré les progrès considérables réalisés dans la compréhension des fondements génétiques du mélanome, l'utilisation de ces données à des fins de diagnostic, de pronostic ou de traitement reste limitée.

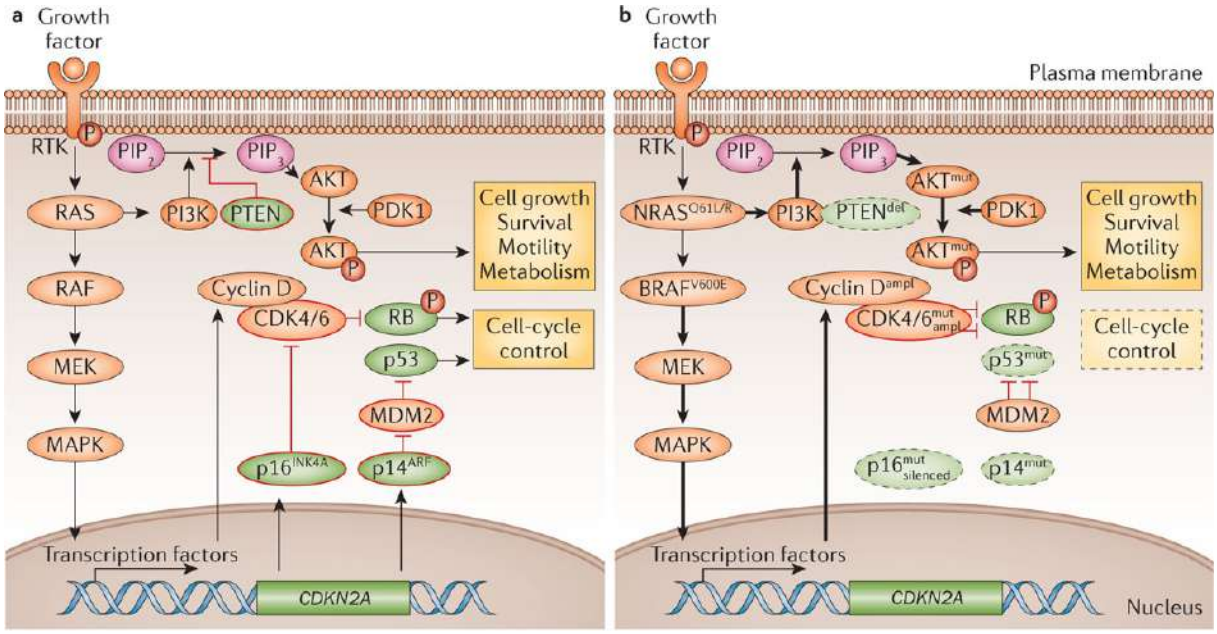


Figure 5. **Les principales voies de signalisations altérées dans le mélanome [38]**. La voie des MAPK est activée de manière constitutive dans la majorité des mélanomes. Cela est généralement la conséquence de mutations affectant BRAF ou NRAS.

b. <u>Diagnostique</u>

Le mélanome cutané est de très bon pronostic s'il est détecté à un stade précoce. Il est donc crucial de le diagnostiquer suffisamment tôt. Ce cancer à la particularité d'être pigmenté et d'apparaitre au niveau de la peau, l'auto-détection est donc la manière la plus fréquente d'identifier un mélanome [39]**.** Un examen dermatologique est cependant nécessaire pour confirmer l'apparition de lésions cancéreuses. Le dermatologue s'aide des critères ABCDE comme méthode simple pour identifier l'apparition du mélanome. L'acronyme signifiant A : Asymétrie, B : Bord (irrégulier), C : Couleur (hétérogène), D : Diamètre (> 6mm), et E : Evolution [40]**.** Cette méthode permet d'identifier environ 70% des mélanomes, cependant l'utilisation du dermoscope, un outil non invasif permettant l'étude en profondeur de la peau, améliore la précision du diagnostic jusqu'à 90% et réduit, par conséquent, les biopsies inutiles [41,42]**.**

En ce qui concerne les personnes à risque, un suivi régulier, avec prise de photo, de tout le corps peut être effectué par le dermatologue. Ainsi les changements minimes peuvent être détectés rapidement. Cette stratégie combinée à une dermoscopie digitale a démontré son efficacité dans la détection, de mélanomes, à un stade précoce, chez des patients à haut risque [43]**.** Lors d'une suspicion de lésion précancéreuse, une exérèse suivie d'un marquage hématoxyline/éosine sont effectués afin de confirmer le diagnostic. Cependant, par manque de

critères reproductibles pour tous les types de mélanome, le diagnostic peut être compliqué à poser [44]. C'est pourquoi, des marquages d'immunohistochimie, souvent dirigés contre le marqueur S100 sont fréquemment réalisés en complément pour valider le diagnostic [45]. De plus, la microscopie confocale par réflectance (MCR), qui permet l'observation des différentes couches de la peau avec une résolution presque histologique, pourrait révolutionner le diagnostic futur du mélanome [46].

Tous ces efforts au diagnostic participent très certainement à la stabilisation de la mortalité observée depuis quelques années.

c. Classification

	Definition
T classification	
T1	
A	<0·8 mm thickness, no ulceration
B	0·8–1 mm thickness (<0·8 mm with ulceration)
T2	
A	>1–2 mm thickness, no ulceration
B	>1–2 mm thickness with ulceration
T3	
A	>2–4 mm thickness, no ulceration
B	>2–4 mm thickness with ulceration
T4	
A	>4 mm thickness, no ulceration
B	>4 mm thickness with ulceration
N classification	
N0	No regional lymph nodes affected
N1a–c	One lymph node affected, micro-metastasis or macro-metastasis, or in-transit or satellite metastasis
N2a–c	Two to three lymph nodes affected, or at least one lymph node affected and in-transit or satellite metastasis
N3a–c	At least four lymph nodes affected or at least two lymph nodes affected and matted nodes
M classification	
M0	No evidence of distant metastasis
M1	
a	Distant metastasis to skin
b	Distant metastasis to lung
c	Distant non-CNS metastasis
d	CNS metastasis

	T classification	N classification	M classification
Stage 0	Tis	N0	M0
Stage 1A	T1a or T1b	N0	M0
Stage 1B	T2a	N0	M0
Stage 2A	T2b or T3a	N0	M0
Stage 2B	T3b, T4a, or T4b	N0	M0
Stage 2C	T0	N1b and N1c	M0
Stage 3A	T1a–b to T2a	N1a of N2a	M0
Stage 3B	T0	N2b, N2c, N3b, or N3c	M0
Stage 3B	T1a–b to T2a	N1b–c or N2b	M0
Stage 3B	T2b–T3a	N1a–N2b	M0
Stage 3C	T1a–T3a	N2c or N3a–c	M0
Stage 3C	T3b–T4a	Any N ≥N1	M0
Stage 3C	T4b	N1a–N2c	M0
Stage 3D	T4b	N3a–c	M0
Stage 4	Any T and Tis	Any N	M1

Figure 6. Classification TNM du mélanome selon l'AJCC (8ème édition).

La classification histologique la plus utilisée dans la littérature et en clinique est établie par l'American Joint Committee on Cancer (AJCC). Cette classification se nomme TNM et se base sur des critères histopathologiques. Le T décrit l'épaisseur et l'ulcération de la tumeur, le N décrit l'état du ganglion lymphatique sentinelle et le M correspond à la présence de

métastases. A cette classification s'associe le stade pathologique allant du stade 0 correspondant à un mélanome *in situ* jusqu'au stade 4 correspondant au mélanome métastatique. (Figure 6)

d. Traitements

Le choix du traitement dépend des critères anatomopathologiques du mélanome au moment du diagnostic. Le stade clinique selon la classification TNM, la localisation, et l'état mutationnel seront pris en compte. La figure ci-dessous représente le schéma thérapeutique actuellement recommandé par la base de données VIDAL.(Figure 7)

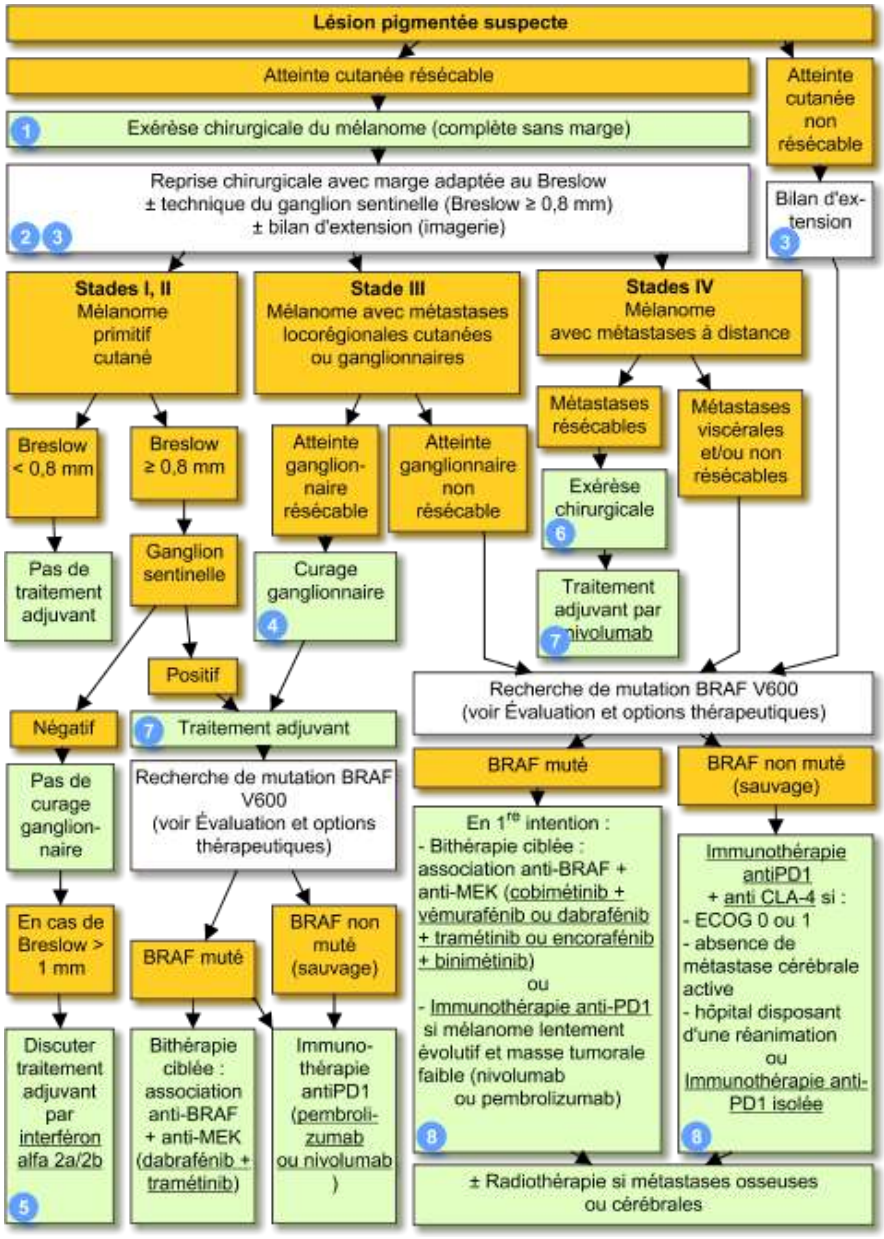


Figure 7. Recommandations pour la prise en charge du mélanome en 2022 (source VIDAL) [47].

i. *Exérèse de la tumeur primaire*

La première approche thérapeutique lors d'une suspicion de mélanome est l'exérèse de la lésion. Cette biopsie de diagnostic permettra de déterminer l'indice de Breslow caractérisant l'épaisseur de la tumeur. Cela déterminera la marge à adopter lors de la reprise chirurgicale. Habituellement, des marges de 0,5 cm sont recommandées pour les mélanomes *in situ*, des marges de 1 cm pour les tumeurs d'une épaisseur inférieure ou égale à 2 mm et des marges de 2 cm pour les tumeurs d'une épaisseur supérieure à 2 mm. Différentes études démontrent que la taille de la marge bien que réduisant les récidives locales n'affecte pas réellement la survie globale. C'est pourquoi, une réduction de la marge de sécurité est acceptée lorsque la localisation du mélanome l'exige (visage, articulations …) L'indice de Breslow détermine également si une biopsie du ganglion lymphatique sentinelle est nécessaire. Cette biopsie aidera à confirmer le stade du mélanome et aiguillera le choix de la thérapie adjuvante.

ii. *Thérapies adjuvantes*

Pour des mélanomes de stade 2B, 2C, 3 et 4 résécables, une thérapie adjuvante, ayant pour but de limiter les rechutes et la propagation métastatique, est envisageable. Historiquement, le traitement par IFNα a été l'une des premières thérapies adjuvantes. Cependant une méta-analyse a démontré que malgré un léger effet bénéfique de cette thérapie sur la survie sans récidive, la survie globale, après 5 ans, n'était améliorée que de seulement 3% [48]**.** Par la suite, les thérapies ciblées BRAF/MEK et les immunothérapies anti-CTLA-4/anti-PD-1, qui se sont révélées efficaces pour le traitement des mélanomes métastatiques, ont permis de faire évoluer les thérapies adjuvantes (discuté ci-après).

iii. *Les thérapies ciblées*

Le traitement de première ligne pour les mélanomes métastatiques ou localement avancés, mutés BRAF, est l'utilisation des inhibiteurs de BRAF. Il en existe 3 sur le marché, le vémurafénib, le dabrafénib et l'encorafénib. Des études précliniques ont démontré que ces inhibiteurs induisent une inhibition sélective de l'activité kinase BRAF dans les lignées cellulaires de mélanome mutées $BRAF^{V600}$, bloquant la phosphorylation de ERK et entraînant une inhibition de la prolifération cellulaire, un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules [49–51]**.** Au début des années 2010, le dabrafénib et le vémurafénib sont approuvés en clinique et montrent une meilleur efficacité anti-tumorale que les chimiothérapies, avec la moitié des patients mutés BRAF bénéficiant de leurs effets [51,52]**.** De nos jours, les inhibiteurs de BRAF sont désormais couplés avec des inhibiteurs de MEKs. En effet, plusieurs études de phase 3 démontrent que cette combinaison permet d'augmenter la réponse objective jusqu'à 70%.

Même si seulement 16% des patients présentent une réponse complète, 74% des individus montrent tout de même une réponse partielle ou une stabilisation de la maladie [53–55]**.** Depuis 2018, la combinaison dabrafénib et tramétinib (inhibiteur de MEK) est également utilisée en traitement adjuvant des mélanomes de stade 3A-C mutés BRAF. Après 3 ans de traitement, le pourcentage de survie sans rechute est de 58% avec la combinaison contre 39% dans le groupe contrôle [56].

Malheureusement, malgré l'avancée que constitue cette stratégie thérapeutique, que cela soit en traitement adjuvant ou principal, une partie des patients ne répondent pas initialement au traitement et la majorité de ceux qui répondent développent des résistances très rapidement [57]**.** La non réponse initiale de certains patients est dû à des résistances intrinsèques souvent associées à une altération génétique secondaire. Par exemple, les mutations de PTEN [58] et de RAC1 [59] ou encore l'amplification de la cycline D1 [60] participent à ce type de résistances. Les résistances secondaires, quant à elles, résultent souvent de l'acquisition de mutations réactivant la voie MAPK ou activant des voies alternatives soutenant la croissance cellulaire. La réactivation de la voie MAPK survient généralement de l'amplification de BRAF ou des mutations de NRAS et MEK2 [61]**.** L'activation oncogénique de la voie PI3K/AKT participe également aux résistances secondaires [62]**.**

iv. *Les immunothérapies*

Le mélanome est considéré depuis bien longtemps comme un cancer immunogène. Dès les années 70, des lymphocytes T infiltrant la tumeur (TIL) ont pu être observés dans le mélanome dès le stade RGP [63]**.** Depuis, énormément d'études se sont intéressées aux TIL, acteurs centraux de la réponse anti-tumorale. En effet, la présence de TIL au sein de la tumeur est souvent associée à un bon pronostic pour les patients atteints de mélanome. La forte charge mutationnelle de ces tumeurs permet la formation de néoantigènes pouvant être reconnus par les lymphocytes T CD8, qui déclenchent une réponse anti-tumorale [64]. De plus, les cellules de mélanome possèdent la particularité d'exprimer des antigènes de différenciation mélanocytaire. Ces protéines, normalement exprimées dans les mélanocytes, vont activer le système immunitaire dans un contexte tumoral. En se basant sur ces observations, des thérapies cherchant à stimuler le système immunitaire, telles que des traitements par IFNα [65] ou IL2 [66], ou des vaccins dérivés d'antigènes peptidiques synthétiques [67], ont été mis en place. Malgré certaines preuves d'efficacité, ces essais n'ont pas réussi à démontrer un bénéfice durable chez les patients atteints de mélanome avancé.

L'inefficacité de ces thérapies peut s'expliquer par la capacité des cellules cancéreuses à échapper au système immunitaire. La découverte des points de contrôles immunitaires CTLA-4 et PD-1, respectivement, par le Docteur James Allison et le Professeur Tasuku Honjo, a permis de mettre en lumière un des mécanismes d'inactivation du système immunitaire [68,69]**.** De manière physiologique, ces récepteurs servent de frein et permettent d'éviter une réponse immunitaire exacerbée. Dans un contexte de cancer, les cellules tumorales expriment les ligands de ces récepteurs et inactivent la réponse anti-tumorale. Le blocage de ces récepteurs par des anticorps (anti-CTLA-4 et anti-PD-1) permet d'augmenter de façon spectaculaire la réponse anti-tumorale. Cette découverte marque le début de la révolution des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire dans le traitement du mélanome métastatique [68].

Une étude clinique de phase 3, l'étude Checkmate-067, a suivi l'évolution de patients atteints de mélanome avancé traités par anti-PD-1 (nivolumab), anti-CTLA-4 (ipilimumab) ou par l'association des deux (nivolumab et ipilimumab) [70]. Avec un taux de survie à 5 ans de 57% pour la combinaison versus 44% pour la monothérapie anti-PD-1 et 26% pour la monothérapie anti-CTLA-4, l'efficacité de l'association a été démontré supérieure à celle des monothérapies. Ceci a mené à l'approbation du nivolumab associé à l'ipilimumab pour le traitement du mélanome métastatique. Cependant, des effets indésirables de grade 3 et 4, liés au traitement combiné, surviennent chez 56 % des patients, et 30 % d'entre eux ont dû interrompre leur traitement en raison d'effets indésirables. La question du bénéfice de la combinaison versus la monothérapie anti-PD-1 présentant moins d'effets indésirables a donc été posée. La monothérapie anti-PD1 est par ailleurs utilisée en traitement adjuvant et a démontré une meilleure efficacité et tolérabilité que la monothérapie anti-CTLA-4 [71].

Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire ont montré des bénéfices sans précédent dans la prise en charge de patients atteints de mélanome métastatique. Cependant, la moitié d'entre eux ne répondent pas et un tiers des répondeurs finissent par rechuter. Ainsi comprendre les mécanismes de résistances dans le contexte des immunothérapies mais également celui des thérapies BRAF/MEK, constitue un élément crucial pour le développement de thérapies émergentes.

3) La dédifférenciation des cellules de mélanome

La dédifférenciation des cellules de mélanome est un mécanisme très similaire à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) qui participe à la fois à la progression métastatique et à la résistance aux thérapies.

a. Le modèle du switch phénotypique

Au sein de la tumeur, les cellules de mélanome peuvent être retrouvées dans différents états phénotypiques. Ces états sont caractérisés par des programmes transcriptionnels spécifiques. L'un des premiers modèles expliquant l'hétérogénéité phénotypique du mélanome se basait sur le niveau d'expression de MITF. MITF est un facteur de transcription clé dans la différenciation des mélanocytes [72]. Dans le mélanome, il a été observé qu'une faible expression de MITF ($MITF^{low}$) est associée à un ralentissement du cycle cellulaire dû à une forte expression de p27 et à une augmentation des capacités d'invasion des cellules. Au contraire, une forte expression de MITF ($MITF^{high}$) promeut la prolifération et réduit les capacités invasives. De façon surprenante, une activité encore plus importante de MITF est associée à un phénotype hyper différencié peu prolifératif [73]. Il semblerait que l'expression de MITF soit un rhéostat de l'état de différenciation et des capacités de prolifération des cellules de mélanome. Par la suite, une étude majeure, basée sur l'analyse de l'expression génique de 86 lignées cellulaires de mélanome, a permis de constituer 3 clusters différents caractérisés par un motif d'expression génique spécifique et associés à des potentiels métastatiques différents [74]. Dans cette étude, le cluster A est associé à un phénotype dit « prolifératif » et est marqué par une expression importante de MITF et de SOX10. Le cluster C est associé à un phénotype "invasif" et se caractérise par une signature TGFβ. Un cluster B présentant un phénotype intermédiaire a pu également être décrit. Des études supplémentaires, dont une réalisée sur des biopsies de mélanomes, ont mis en évidence l'implication des facteurs de transcription de la famille AP1/TEAD, de la protéine Wnt5A et du récepteur tyrosine kinase AXL dans le phénotype invasif [75,76]. De manière intéressante, une étude réalisée chez la souris montre que la croissance de cellules de mélanome dites prolifératives est plus importante que celle de cellules de mélanome ayant un phénotype invasif. Dans les deux cas, la tumeur formée présente une hétérogénéité pour l'expression de MITF [77]. Ces observations ont donné naissance au modèle du switch phénotypique, où sous l'influence du microenvironnement les cellules de mélanome peuvent passer d'un phénotype prolifératif vers un phénotype invasif et vice-versa. Cela permet aux cellules tumorales de métastaser puis de proliférer, de nouveau, au niveau du site métastatique.

Ce modèle de base a depuis évolué. Diverses études démontrent qu'il ne s'agit pas simplement d'un switch entre deux états mais qu'il existe un continuum d'états allant du plus différencié au moins différencié [78,79]. Une analyse de Tsoi *et al*., sur un panel de 53 lignées cellulaires de mélanome identifie 4 classes de mélanome (C1-C4) [78]. Les classes C1 et C2,

expriment toutes deux le marqueur AXL, et correspondent à la cohorte C MITF^{low}, décrite par Hoek *et al.* [74], mais se distinguent par l'expression des facteurs de transcription SOX9 dans la classe C1 et SOX10 dans la classe C2. La classe C4 est la plus différenciée, elle exprime MITF et un répertoire de facteurs de transcription associés à la différenciation. Elle est liée à la cohorte A MITF^{high} décrite par Hoek *et al.* [74]. La classe C3 a un phénotype intermédiaire, exprimant à la fois MITF et des marqueurs des cellules de la crête neurale comme NGFR, par exemple. Les états transitoires C2 et C3 rappellent les cellules de la crête neurale dont dérivent les mélanocytes, à la fois prolifératif et invasif. Le modèle du switch d'un état prolifératif vers un état invasif laisse donc place au modèle de la dédifférenciation des cellules de mélanome.

Tous les différents états de dédifférenciation semblent coexister au sein de la tumeur primaire. En effet, une analyse de single-cell RNAseq, a mis en avant l'existence au sein des tumeurs de patients de la coexistence de cellules MITF^{low}/AXL^{high} et de cellules MITF^{high}/AXL^{low} [80]**.** De plus, une étude s'intéressant au phénotype des cellules de mélanome circulantes démontre une hétérogénéité dans l'expression de MITF et des facteurs souches [81]**.** Les cellules de mélanome avec des phénotypes différents collaborent entre elles et mettent en place un mécanisme d'invasion efficace [82,83]. (Figure 8).

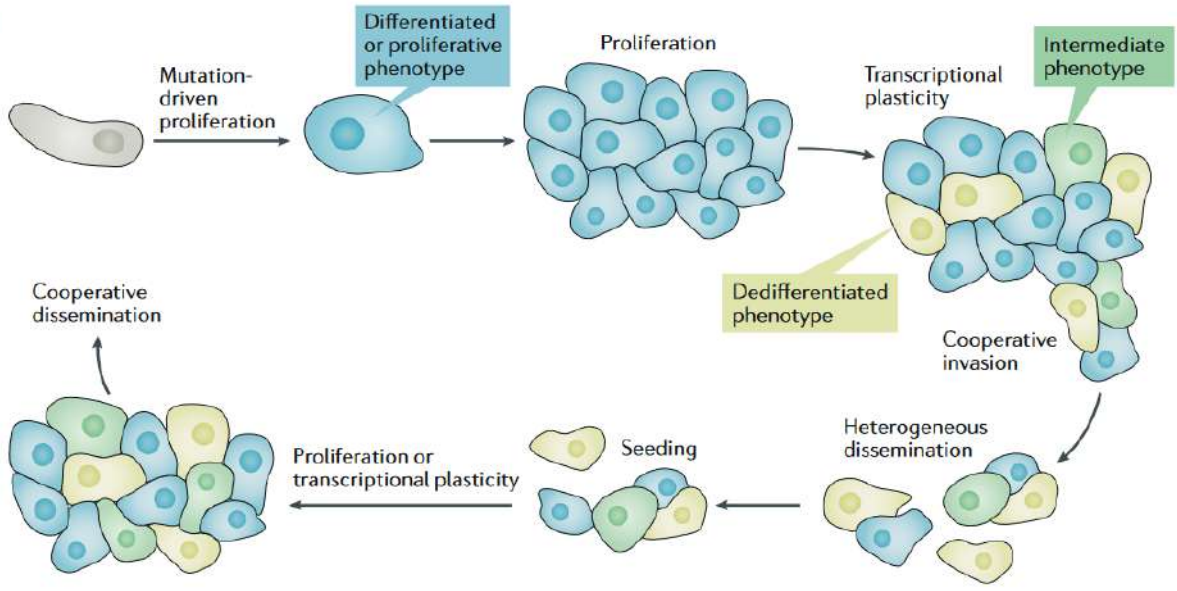


Figure 8. Modèle de la dédifférenciation des cellules de mélanome [84] Les différents phénotypes coopèrent entre eux afin de répondre aux besoins de prolifération et d'invasion de la tumeur.

b. <u>Les facteurs induisant la dédifférenciation des cellules de mélanome</u>

Divers facteurs du microenvironnement tumoral mais également des facteurs intrinsèques aux cellules cancéreuses sont capables d'induire la dédifférenciation des cellules

de mélanome. Par exemple, des facteurs très fortement associés à la transition épithélio-mésenchymateuse ou à une signature invasive, comme le TGFβ ou Wnt5a, sont acteurs de ce phénomène [85]**.** De même, la seule surexpression de SOX9 [86], marqueur de la signature dédifférenciée, ou encore celle de NGFR [87], marqueur de l'état neural-crest like, induit la dédifférenciation et favorise l'invasion tumorale. De manière intéressante, il est aussi montré que le switch de certains facteurs de transcription de l'EMT, comme exemple SNAI2 et ZEB2 vers TWIST1 et ZEB1, qui est associé à l'activation oncogénique de NRAS/BRAF, participe à la dédifférenciation des cellules de mélanome [88]**.** Plusieurs études ont d'ailleurs confirmé le rôle de ZEB2 dans la promotion du phénotype prolifératif et ZEB1 dans celle du phénotype invasif [89–91]. Des facteurs plus environnementaux peuvent également stimuler la dédifférenciation des cellules de mélanome. Par exemple, une étude démontre que des cellules de mélanome $MITF^{high}$ cultivées dans un milieu pauvre en glutamine deviennent invasives, et celles possédant au préalable un phénotype $MITF^{low}$ augmentent leurs capacités invasives. La privation en glutamine entraîne une inhibition du facteur d'initiation de la traduction eIF2B, ce qui aboutit à une diminution de la transcription de MITF *via* ATF4 [92]**.** Un mécanisme similaire impliquant ATF4 a pu être rapporté lors d'une privation en glucose [93]**.** Il est intéressant de noter que les résultats obtenus avec la privation en glutamine ont également été obtenus lors d'un traitement des cellules par du TNF. Cette cytokine majeure de l'inflammation est aussi un médiateur crucial de la dédifférenciation des cellules de mélanome. En effet, le TNF est capable de diminuer l'expression de MITF *via* c-JUN. MITF étant un répresseur de c-JUN, cette diminution entraîne une boucle de régulation positive menant à un état, $MITF^{low}$/$c\text{-}JUN^{high,}$ très pro-inflammatoire [92]**.** Une autre étude démontre que le TNF régule MITF *via* la voie NF-κB [94]. Enfin, de multiples études démontre un rôle de l'hypoxie dans la dédifférenciation des cellules de mélanome [95–97]**.** Il semblerait donc que ce processus confère aux cellules cancéreuses une plasticité nécessaire pour s'adapter aux divers stress du microenvironnement tumoral.

c. <u>Rôle de la dédifférenciation des cellules de mélanome dans la résistance aux traitements</u>

L'agressivité du mélanome est autant liée à sa propension de former des métastases qu'à sa capacité à échapper aux traitements. La dédifférenciation des cellules de mélanome est un processus qui a pu être observé dans ce contexte de résistance.

i. *Résistance aux inhibiteurs de la voie MAPK*

Dans le modèle publié par Tsoi *et al.,* il a été observé que des lignées de mélanome traitées par le vémurafenib, devenant résistantes au traitement, subissaient également un phénomène de dédifférenciation [78]. Plusieurs études de séquençage de l'ARN à l'échelle de la cellule unique (single cell RNA-seq ou scRNA-seq) font états de l'apparition d'une population transitoire exprimant des marqueurs invasifs tels que NGFR, AXL ou c-JUN, avec un cycle cellulaire ralenti, après traitement avec des inhibiteurs de MAPK [98–100]**.** Cette population semble disparaître lors de l'arrêt du traitement et à l'inverse, gagner en stabilité si le traitement est maintenu. Toutes ces études rapportent également une hétérogénéité tumorale. Ces observations sont en accord avec le modèle proposé par le groupe du Professeur Jean-Christophe Marine [79]**.** En effet, à partir de scRNA-seq réalisés sur des modèles PDX (Patient Derived Xenografts) dérivés de mélanomes résistants aux inhibiteurs de la voie MAPK (dabrafénib et tramétinib), le groupe a montré que 4 états cellulaires pouvaient coexister lors de la maladie résiduelle : des cellules $MITF^{high}$ (similaire au C4 proposé par Tsoi *et al*. [78]), des cellules totalement dédifférenciées $MITF^{low}$ (similaire au C1), des cellules NCSC exprimant des marqueurs de cellules souches mais exprimant encore SOX10 (similaire au C2), et des cellules SMC (starved melanoma cell) exprimant MITF de façon intermédiaire ainsi que des facteurs associés à une privation métabolique. Parmi ces populations, la population NCSC semble la plus prédominante dans la résistance et montre des caractéristiques réversibles. Une analyse en pseudo-temps permet de faire émerger le modèle suivant : sous l'influence du traitement les cellules $MITF^{high}$ prolifératives adoptent un phénotype « starved » transitoire, qui si le stress se maintient, peuvent adopter un phénotype hyper-différencié $MITF^{high}$ mais peu prolifératif ou un phénotype dédifférencié $MITF^{low}$ de type invasif $SOX10^{low}$ ou de type NCSC $SOX10^{medium}$ (Figure 9) Il semblerait donc que les cellules adoptent des états peu prolifératifs proche de la quiescence pour s'adapter au stress environnant. Si ce stress s'interrompt les cellules reprennent un phénotype prolifératif, s'il est maintenu, les cellules déclenchent un programme d'invasion pour essayer d'échapper au stress du microenvironnement tumoral.

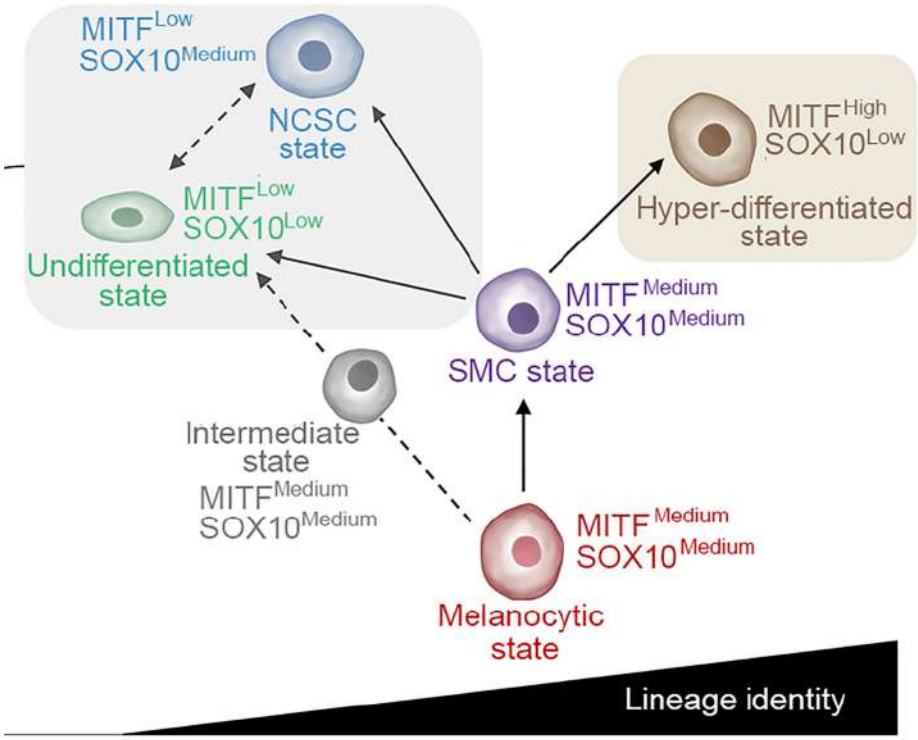


Figure 9. Modèle de la dédifférenciation des cellules de mélanome dans la résistance aux traitements [101]

De manière générale, tous les états MITF^{low} sont associés à l'augmentation d'expression de multiples récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) tels que NGFR [102], AXL [103,104], EGFR [103], RXR [79], PDGFR [105], IGF-1R [106], ROR2 [107]. Ces RTKs activent souvent des signalisations menant à des phénotypes résistants aux thérapies. Ainsi, de nombreuses études montrent que l'inhibition de ces RTKs sensibilise les mélanomes aux thérapies ciblées. (Tableau 1)

Le phénotype MITF^{high} peu prolifératif, décrit initialement dans le modèle du rhéostat de MITF, est également important dans la résistance aux thérapies ciblées. En effet, des études observent une augmentation de MITF lors des phases initiales d'un traitement avec des inhibiteurs de la voie MAPK (MAPKi) ou chez des patients dits progresseurs. Cette augmentation pourrait être : i) due à l'apparition des mutations secondaires, aboutissant à une amplification de MITF et à une réactivation de voies de survie ou ii) associée à l'augmentation de la signalisation PAX3, qui régule positivement MITF et protège, par conséquent, de la mort induite par les MAPKi [108,109].

De façon originale, il existe une coopération et une communication entres les cellules $MITF^{high}$ et $MITF^{low}$. Une étude a découvert que le milieu conditionné de cellules sensibles au vémurafenib augmente l'agressivité des cellules résistantes. Le sécrétome des cellules sensibles active la voie de survie PI3K/AKT de façon autocrine et paracrine sur les cellules résistantes afin de contourner l'inhibition de la voie MAPK [110]**.** De même, il a été montré que dans un contexte de traitement par MAPKi, les cellules de mélanome $MITF^{high}$ sont capables de sécréter de l'endothéline 1 (EDN1). Cette dernière confère une résistance aux MAPKi par la réactivation des kinases ERK *via* le récepteur B à EDN1 (EDNRB) dans les cellules $MITF^{high}$ et le récepteur A à EDN1 (EDNRA) dans les cellules AXL^{high} [111].

Cible	**Stratégie d'inhibition**	**Thérapie**	**Modèle**
ROR2 [107]	siRNA	Vémurafenib	*In Vitro* : Lu1205
PDGFRB [105]	shRNA	Vémurafénib	*In Vitro* : M229 et M238
IGF-1R [106]	Inhibiteur (PPP)	Tramétinib, Selumetinib	*In Vitro* : 451Lu et Mel1617
RXR [79]	Antagoniste (HX531)	Dabrafenib, Trametinib	*In Vivo* : Souris PDX
EGFR [103]	Inhibiteur (Gefinitib)	Vémurafenib	*In Vitro* : A875
NGFR [102]	shARN Inhibiteur (AG-879)	Lymphocytes T cytotoxiques	*In Vitro* : co-culture LT-M009 *In Vivo*: Souris
AXL [104]	Inhibiteur (BGB324)	Vémurafenib	*In Vitro* : Melmet1, A375, WM1366, *In Vivo* : Souris Nude Melmet1 en sous-cutané
AXL [103]	Inhibiteur (R428)	Vémurafenib	*In Vitro* : *A*875, 06.33A 95.23 518.A2

Tableau 1. Les principaux RTKs participant à la dédifférenciation du mélanome

ii. Résistance aux immunothérapies

L'inflammation est un inducteur de la dédifférenciation des cellules de mélanome, notamment *via* un de ses médiateurs, le TNF. Dans un contexte d'immunothérapie, le TNF produit par les cellules immunitaires activées peut donc entraîner la diminution de MITF et, par conséquent, la perte des antigènes mélanocytaires. Or, la reconnaissance de ces antigènes par le système immunitaire est un signal crucial dans la réponse anti-tumorale [112]**.** La première observation de ce phénomène a été faite dans un modèle murin de transfert adoptif de lymphocyte T (ACT). Les tumeurs résistantes présentaient un bon infiltrat immunitaire mais des cellules tumorales ayant perdues leurs antigènes mélanocytaires [113]**.** Des analyses *in vitro* ont permis d'identifier que les cellules résistantes possèdent un phénotype similaire à la classe dédifférencié (C1) décrite par Tsoi *et al*. [78]. Ainsi la dédifférenciation des cellules de mélanome induite par le TNF entraîne la perte de reconnaissance des cellules tumorales par les LT CD8 spécifiques et permet l'échappement tumoral. Ribas *et al.* ont par la suite pu observer ce même mécanisme chez un patient atteint de mélanome métastatique traité par ACT [114]. L'un des acteurs clés de la présentation d'antigènes au LT CD8 est le complexe d'histocompatibilité de type I (CMH-I). De façon intéressante, une étude récente démontre que la diminution d'expression du CMH-I par les cellules de mélanome contribue à la résistance aux anti-PD-1 et est associée à une augmentation du phénotype invasif [115]**,** suggérant que la dédifférenciation des cellules de mélanome participe à la résistance au traitement par anti-PD-1. Ceci est en accord avec la signature génique de résistance innée à l'immunothérapie anti-PD-1 (IPRES), caractérisée par Hugo *et al*. et qui comprend une augmentation de l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que *AXL*, *WNT5A* et *TWIST2* [116]**.** De plus, une étude sur 4 types de souris immunocompétentes développant des mélanomes, caractérisés par des états de différenciation distincts et comparables à la classification décrite par Tsoi *et al*., démontre que les tumeurs de phénotype dédifférencié répondent moins bien à une thérapie anti-CTLA-4 [117]**.** En somme, la dédifférenciation semble impliquée à la fois dans les résistances aux thérapies adoptives mais également aux thérapies utilisant des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire. A l'opposé de ces observations, le groupe du Professeur Anthony Ribas a observé dans une cohorte de 68 patients, atteints de mélanome avancés et traités par anti-PD-1, qu'une signature de dédifférenciation dépendante de l'IFNγ serait de bon pronostic [118]. Cependant, il est important de noter que dans cette étude, les auteurs s'intéressent à la dédifférenciation au cours du traitement et non pas à un état de dédifférenciation avant traitement. Cette dédifférenciation pourrait être le signe d'une bonne réponse immunitaire anti-tumorale associée à une signalisation IFNγ fonctionnelle. Une étude de l'évolution des cellules tumorales et du

répertoire T dans cette même cohorte démontre justement que les cellules cancéreuses exprimant les antigènes mélanocytaires sont déplétées chez les répondeurs. Ce phénomène est associé à un répertoire T indiquant une bonne réponse anti-tumorale spécifique comparée aux non répondeurs [119]**.**

Finalement, l'hétérogénéité phénotypique des cellules de mélanome se rajoute à l'hétérogénéité mutationnelle complexifiant la compréhension des mécanismes de progression et de résistance aux traitements.

CHAPITRE 2 : LE MÉTABOLISME DU CÉRAMIDE

1) Structure

Le céramide fait partie de la grande famille de lipides appelée sphingolipides (SL). Ces lipides constituent l'une des classes majeures de lipides chez les eucaryotes. Ils sont exprimés de manière ubiquitaire et sont majoritairement membranaires. Les premières espèces de sphingolipides ont été découvertes au niveau du cerveau, à la fin du 19^{éme} siècle par J.L. Thudicum, célèbre biochimiste allemand. De par leur structure mystérieuse et énigmatique, il leur attribua le nom de sphingolipides en référence à la créature mythologique grecque, le Sphinx. Depuis, les avancées techniques en chimie et biochimie de la première moitié du 20ème siècle ont permis d'élucider le mystère de leur structure. Le céramide en est le métabolite central. Il est composé d'une base sphingoïde de 18 carbones associée à un acide gras par une liaison amide au niveau du carbone C2. (Figure 10) La chaine de l'acide gras associé peut varier par sa longueur allant de 14 à 26 carbones mais également par son degré de saturation et d'hydroxylation. Le céramide constitue le squelette hydrophobe autour duquel s'articule tous les autres sphingolipides complexes. En effet, différents résidus s'associeront au céramide sur son carbone C1 pour former les différentes espèces de la famille des SLs. Ainsi, l'ajout d'un phosphate conduira à la formation de céramide 1-phosphate, tandis que la condensation avec une phosphocholine mènera à la formation de sphingomyéline. (Figure 10) Le céramide peut également s'associer à des oses, composant ainsi, avec environ 500 combinaisons possibles, la grande famille des glycosphingolipides. A l'opposé de l'addition de résidus, le céramide peut être déacylé (soustraction d'un acide gras) par des céramidases afin de former la sphingosine, composée simplement de la base sphingoïde qui pourra à son tour être phosphorylée pour former la sphingosine-1-phosphate. Toutes ces espèces de SLs sont des molécules amphiphiles, la base sphingoïde et l'acide gras représentent la partie hydrophobe, tandis que les résidus phosphates, phosphocholine ou glycosylés composent la partie hydrophile. En fonction des espèces, les propriétés amphiphiles diffèrent donc, le céramide étant l'espèce le plus hydrophobe, de par son simple groupement hydroxyle comme fonction polaire (Figure 10).

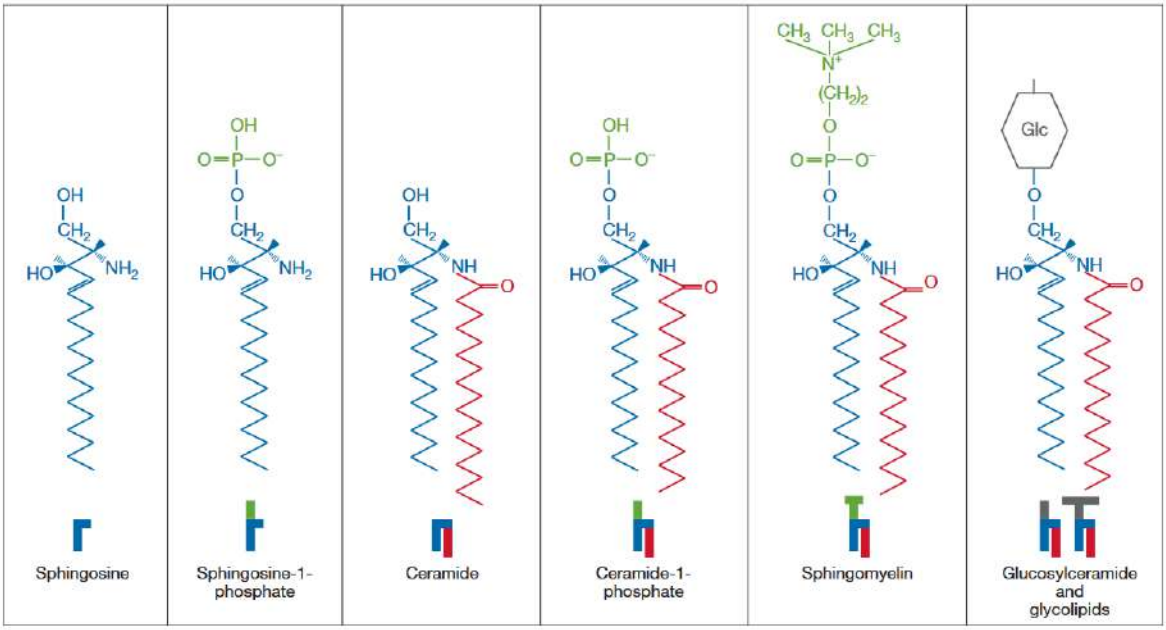


Figure 10. Structure des principaux sphingolipides [120]. En bleu, la base sphingoïde de 18 carbones, en vert le groupement phosphate ou phosphocholine dans le cas de la sphingomyéline, en rouge l'acide gras et en gris le groupement glucose**.**

2) Métabolisme

a. Anabolisme du céramide

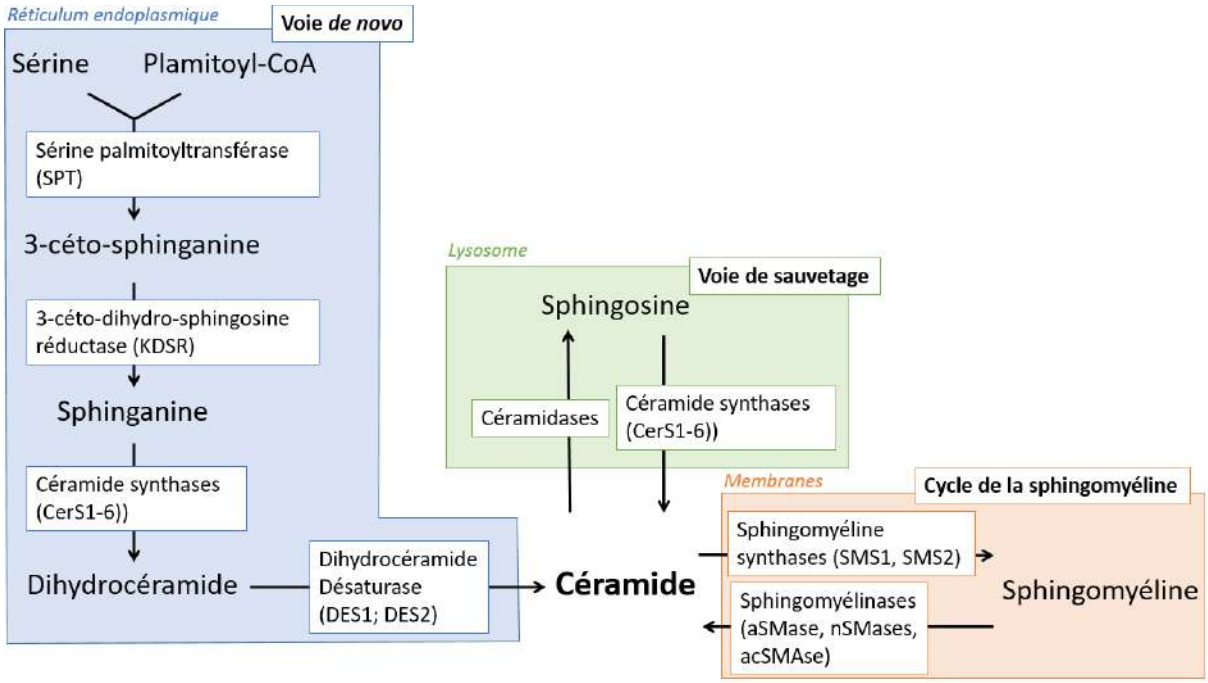


Figure 11. Principales voies de production de céramide. Il existe 3 sources principales de production du céramide : la synthèse de novo à partir de la sérine et du palmitoyl-Coa, la voie de sauvetage qui consiste au recyclage du céramide et enfin le céramide issu de la dégradation de la sphingomyéline.

i. *La synthèse de novo*

La synthèse de novo du céramide commence au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Elle nécessite l'action de la sérine palmitoyltransférase (SPT) qui condense une L-sérine et un palmitoyl-CoA en 3-céto-sphinganine. (Figure 11) La SPT est formée de deux sous unités SPT1 et SPT2, codées respectivement par deux gènes *SPTLC1* et *SPTLC2,* qui formeront l'enzyme active présente au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) [121]. Il y a quelques années, un 3ème gène, *SPTLC3*, codant pour une protéine SPT3 à 68% homologue avec SPT2, a été identifié [122]. De manière moins fréquente, la SPT peut donc être formée d'un hétérodimère composé de SPT1 et SPT3, ce qui favoriserait la formation de base sphingoïde à 16 carbones au lieu de 18 classiquement. Cette base sphingoïde résulte de la condensation d'un myristate (C14 :0) et d'une sérine [123]. Il est à noter l'existence de désoxysphingolipides, formés à partir d'une base sphingoïde résultant de la condensation d'une alanine et d'un palmitoyl-coA. Les déoxysphingolipides étant dépourvus de groupement hydroxyle sur le C1 de la base sphingoïde, ils ne peuvent pas être métabolisés en sphingolipides complexes [124]**.**

La 3-céto-sphinganine générée par la SPT est réduite en sphinganine (Sa), de manière NADPH dépendante, par l'action de la 3-céto-dihydro-sphingosine réductase (KDSR) [125]. La sphinganine est ensuite transformée en dihydrocéramide (dhCer), après ajout d'un acyl-CoA au niveau de la fonction amine en C2 par une céramide synthase (CerS). (Figure 11) Il existe 6 isoformes de cette enzyme (CerS1-6) codés par 6 gènes distincts. Bien que possédant des fonctions redondantes, chaque isoforme peut présenter des préférences sur le type d'acyl-CoA utilisé ainsi qu'un tropisme tissulaire différent. Par exemple, les CerS5 et 6 vont plutôt utiliser des acyl-Coa à 14 ou 16 carbones et la CerS1, quant à elle, utilisera des steroyl-Coa à 18 carbones. Tandis que, la CerS2, généralement plus abondamment exprimée que les autres, forme du dhCer à longue chaine comprenant 20 à 26 carbones. Finalement, la CerS3, préférentiellement exprimée dans les testicules et l'épiderme forme du dhCer à très longue chaine (>C26) [126]. La dernière étape se déroulant dans le RE consiste en une désaturation entre le carbone C4 et C5 du dhCer, par l'action d'une Δ4-désaturase (DES1 ou DES2), permettant de générer le céramide [127,128]. (Figure 11)

ii. *La voie de sauvetage*

La production de céramide peut également provenir de la dégradation des SLs complexes *via* la voie de sauvetage. Cette voie de production contribue à 50 voire 90% de la biosynthèse des SLs. Ce processus se déroule dans le compartiment lysosomal par l'action de

différentes enzymes fonctionnant à pH acide. Les glycosphingolipides présents au niveau de la membrane plasmique sont internalisés *via* un mécanisme d'endocytose pour rejoindre le lysosome [129]. Suite à l'action séquentielle de différentes hydrolases, les GLs complexes sont dégradés en leur forme la plus simple, le glucosylcéramide (GlcCer) ou le galactosylcéramide (GalCer) [130]. La dernière étape est donc la dégradation du GlcCer et du GalCer en céramide, respectivement par la glucosylcéramidase (GBA) et la galactosylcérebrosidase (GALC) [131]. De la même façon que les GLs, la sphingomyéline peut également être endocytée vers le lysosome avant d'être dégradée en céramide par l'action de la sphingomyélinase acide (aSMase) [132]. Le céramide ne pouvant pas sortir du lysosome [133], il est déacylé en sphingosine par la céramidase acide (AC). La sphingosine peut sortir du lysosome et participer à la biosynthèse des sphingolipides par sa récupération au niveau du RE par les CerS qui le transformeront à nouveau en céramide. (Figure 11) A noter que l'activité de la plupart des enzymes impliquées dans cette voie de sauvetage nécessite l'action de protéines activatrices de sphingolipide (SAPs). Cette famille de protéine comprend les saponines et la protéine GM2A (GM2 Ganglioside Activator) qui servent de cofacteurs aux différentes enzymes impliquées et facilitent la dégradation des SLs complexes [130].

iii. *Le cycle de la sphingomyéline*

L'une des grandes sources de céramide vient de la dégradation de la sphingomyéline. Cette transformation se déroule sous l'action des sphingomyélinases. Il en existe plusieurs types qui différent selon leur localisation et le pH nécessaire à leur activité enzymatique : la sphingomyélinase acide (aSMase), les sphingomyélinases neutres (nSMases) et la sphingomyélinase alcaline (acSMase). La présence d'une sphingomyélinase acide dégradant la SM en céramide dans le lysosome a précédemment été évoquée dans la voie de sauvetage. De plus, il a été montré que lors de stress, l'aSMase pouvait être transloquée au niveau de la membrane plasmique et dégrader la sphingomyéline du feuillet externe afin de produire du céramide. Le céramide formé au niveau de la membrane semble participer à la réorganisation de la membrane, la formation de rafts lipidiques et le clustering de récepteurs [134,135]. De façon similaire, les sphingomyélinases neutres, notamment la sphingomyélinase neutre 2, en réponse au stress transformera la SM membranaire en céramide. Il existe en réalité 4 sphingomyélinases neutres codées par les gènes *SPMD2* à *5*. La nSMase 2, comme mentionnée précédemment, est préférentiellement trouvée au niveau de la membrane plasmique, tandis que les nSMases 1 et 3 se retrouvent plutôt au niveau du RE et de l'appareil de Golgi [132]. *SMPD5* code pour une SMase spécifiquement associée à la mitochondrie. Finalement, la SMase

alcaline, est un peu particulière, puisqu'elle a une localisation intestinale et sert essentiellement à dégrader la sphingomyéline exogène provenant de l'alimentation [136]. (Figure 11)

b. Biosynthèse des sphingolipides complexes

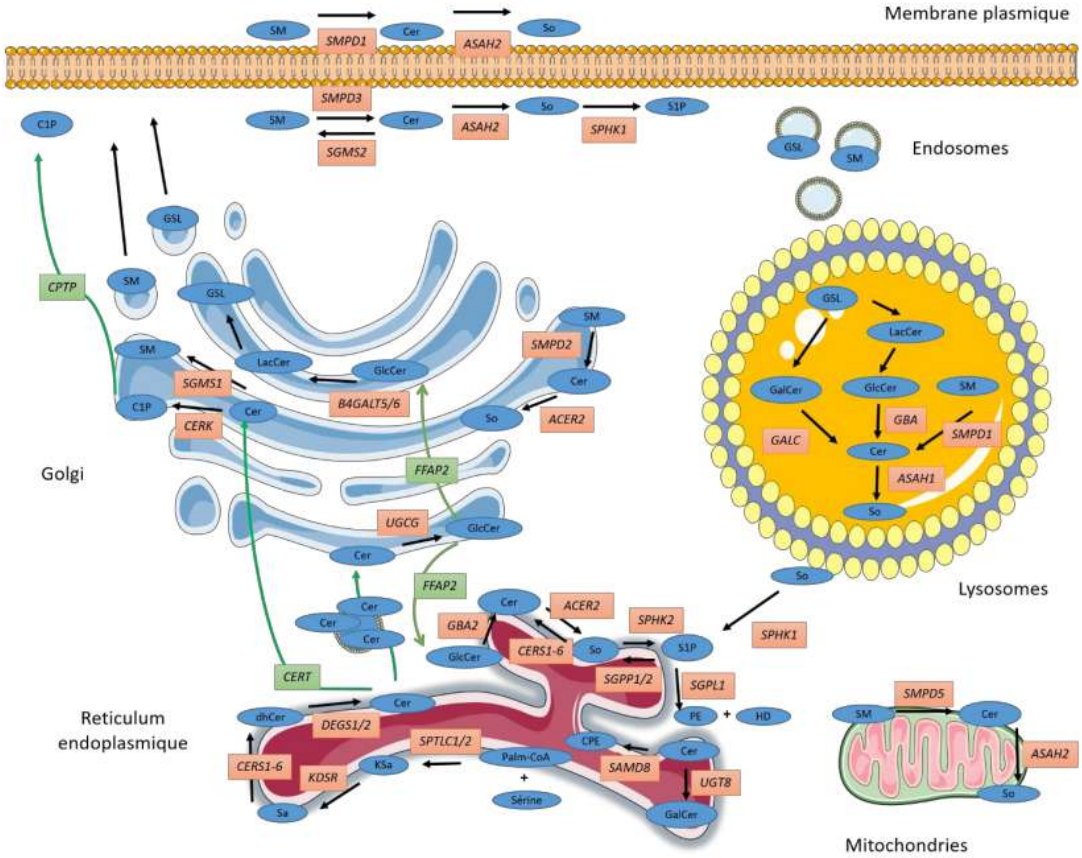


Figure 12. Métabolisme du céramide. La synthèse de novo du céramide commence dans le RE. Le céramide est ensuite transporté vers l'appareil de Golgi où il sera transformé en sphingolipide plus complexe. Il pourra être phosphorylé par la CERK et former le céramide 1-phosphate (C1P), ou être glycolysé pour former les glycosphingolipides (GSL) ou encore condensé avec une phosphocholine pour former la sphingomyéline (SM). Toutes ces espèces sont ensuite transportées vers la membrane plasmique. La dégradation des sphingolipides se déroule dans le lysosome. La sphingosine issue de la dégradation des SL pourra retourner au RE et alimenter de nouveau la formation de céramide et de SL plus complexes, cela constitue la voie de sauvetage. Les GSL peuvent également être dégradés directement dans le RE. La sphingomyéline peut être dégradée au niveau de la membrane plasmique et de la mitochondrie, elle constitue une grande source de céramide. So, sphingosine; Sa , Sphinganine ; KSa, 3-Céto-sphinganine; CPE, céramide phosphateéthanolamine; PE, céramide phospho-éthanolamine ; HD, héxadécenal ; S1P, Sphingosine-1-phosphate ; C1P, Cérmide-1-phosphate ; dhCer, dihydro-Céramide ; GalCer, galactosylcéramide ; GlcCer, glucosylcéramide ; LacCer, lactosylcéramide.

i. Transport du céramide vers l'appareil de Golgi

Comme nous l'avons vu précédemment, le céramide sert de substrat essentiel à la formation des sphingomyélines et glycosylcéramides. Pour cela, le céramide produit durant la synthèse *de novo* (Cf 2-a-i), devra être transporté au niveau de l'appareil de Golgi. Le céramide étant peu hydrophile, le passage du RE vers le Golgi nécessite donc la mise en place de mécanisme de transport. Il peut se faire de deux manières différentes, soit par un transport vésiculaire dépendant de COPII, soit *via* l'action d'un transporteur spécialisé, la protéine CERT (Ceramide Transfer Protein). Le transport vésiculaire va permettre le transfert du céramide vers la partie cytosolique du cis-Golgi, et va apporter le pool de céramide nécessaire principalement à la formation des glycosylcéramides. Cependant, son rôle ne semble pas être primordial puisque son inhibition ne réduit que très partiellement la synthèse de SLs complexes [137]. CERT, quant à elle, est une protéine cytosolique, dont l'action nécessite l'utilisation d'ATP. Grâce à son domaine START, elle extrait le céramide de la membrane du RE pour le transporter vers le trans-Golgi qui est reconnu par son domaine pH. Ce céramide sert principalement à la synthèse des sphingomyélines [138]. A noter que même si CERT est capable de transporter toutes les espèces de céramide, elle semble avoir une préférence pour les céramides ayant une chaine grasse inférieure ou égale à 22 carbones [139]. Une fois dans l'appareil de Golgi, le céramide est pris en charge par différentes enzymes pour former 3 différentes familles de SLs : les céramide-1-phosphates, les sphingomyélines et les glycosylcéramides. (Figure 12)

ii. Formation du Céramide-1-Phosphate

Le céramide, arrivant au trans-Golgi par le transporteur CERT, peut être pris en charge et phosphorylé par la céramide kinase (CERK) afin de former le céramide-1-phosphate (C1P) [140]. La CERK est une enzyme de la famille des DAG kinases, son domaine PH, spécifique du PI4P, lui donne une localisation préférentielle au niveau du trans-Golgi. Son activité peut être régulée par le calcium, le magnésium et la calmoduline, mais également par phosphorylation au niveau de la Ser 340. CERK peut aussi utiliser le céramide provenant de la dégradation de la SM au niveau de la membrane plasmique. En revanche, elle utilise peu le céramide provenant de la dégradation des glycosphingolipides. Le C1P formé est transporté vers les différentes membranes cellulaires. Ce transport se fait par un transporteur cytosolique spécifique nommé CPTP (« Ceramide-1-phosphate transfer protein »). La CPTP peut s'associer avec le trans-Golgi, les membranes périnucléaires et la membrane plasmique mais n'est pas associée aux lysosomes ni au RE [141]. (Figure 12)

iii. Formation de la sphingomyéline

La sphingomyéline est la famille de SL la plus abondamment présente dans la cellule. La majorité des céramides transportés par CERT sert à sa production. Cela nécessite l'action de sphingomyéline synthases (SMS). Il en existe deux isoformes, la SMS1 et la SMS2, respectivement codées par les gènes *SGMS1* et *SGMS2* [142]. Les deux formes sont présentes au niveau de l'appareil de Golgi mais la SMS2 peut également être retrouvée au niveau de la membrane plasmique [143]. La sphingomyéline produite au niveau de l'appareil de Golgi sera transportée par transport vésiculaire, principalement au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique où elle se retrouve majoritairement au niveau des microdomaines [144]. (Figure 12)

iv. Formation des glycosphingolipides

Le céramide, arrivant au cis-Golgi par voie vésiculaire, sert principalement à la production de glycosphingolipides. La première étape est la formation de glucosylcéramide (GlcCer) par l'ajout d'un résidu glucose au niveau du carbone C1 du céramide par la glucosylcéramide synthase (GCS) [145]. Le glucosylcéramide est ensuite transporté vers le trans-Golgi avec l'aide du transporteur FAPP2 [146]. A ce niveau, 2 galactosyltransférases, codés par les gènes *B4GALT5* et *B4GALT6,* ajoutent un galactose sur le glycosylcéramide afin de former le lactosylcéramide (LacCer) [147]. Le LacCer peut être métabolisé en gangliosides. Il existe différentes séries de gangliosides caractérisées par le nombre d'acide sialique ajouté au galactose du LacCer. En effet, la série 0 n'est pas sialylé tandis que les séries a, b et c, portent respectivement 1, 2 et 3 acides syaliques sur le galactose. Différentes transférases vont ensuite travailler de manière séquentielle afin de former les différents gangliosides de chaque série. Les gangliosides sont ensuite transportés du trans-Golgi vers le feuillet externe de la membrane plasmique par transport vésiculaire. A noter que le GlcCer peut également être transporté de manière rétrograde vers le RE par le transporteur FAPP2. L'utilisation ultérieure de ce GlcCer pour la biosynthèse des glycolipides reste à déterminer ; cependant il peut être pris en charge par une glucosylcéramidase non lysosomale (GBA2) qui le retransformera en céramide [148]. (Figure 12)

En parallèle à la formation du GlcCer, le céramide peut également être converti en en galactosylcéramide (GalCer) grâce à l'action de la céramide galactosyltransférase (CGT) codée par le gène UGT8 [149]. A la différence de la GCS, la CGT est localisée au niveau de la membrane du RE, de ce fait la production de GalCer se déroule dans la lumière du RE. Le GalCer est le précurseur des sulfatides qui sont formés par l'action d'une cerebroside sulfotransferase (CST)[150]. La CGT est principalement exprimée au niveau du système nerveux, de ce fait les sulfatides se retrouvent très enrichis dans la myéline. (Figure 13)

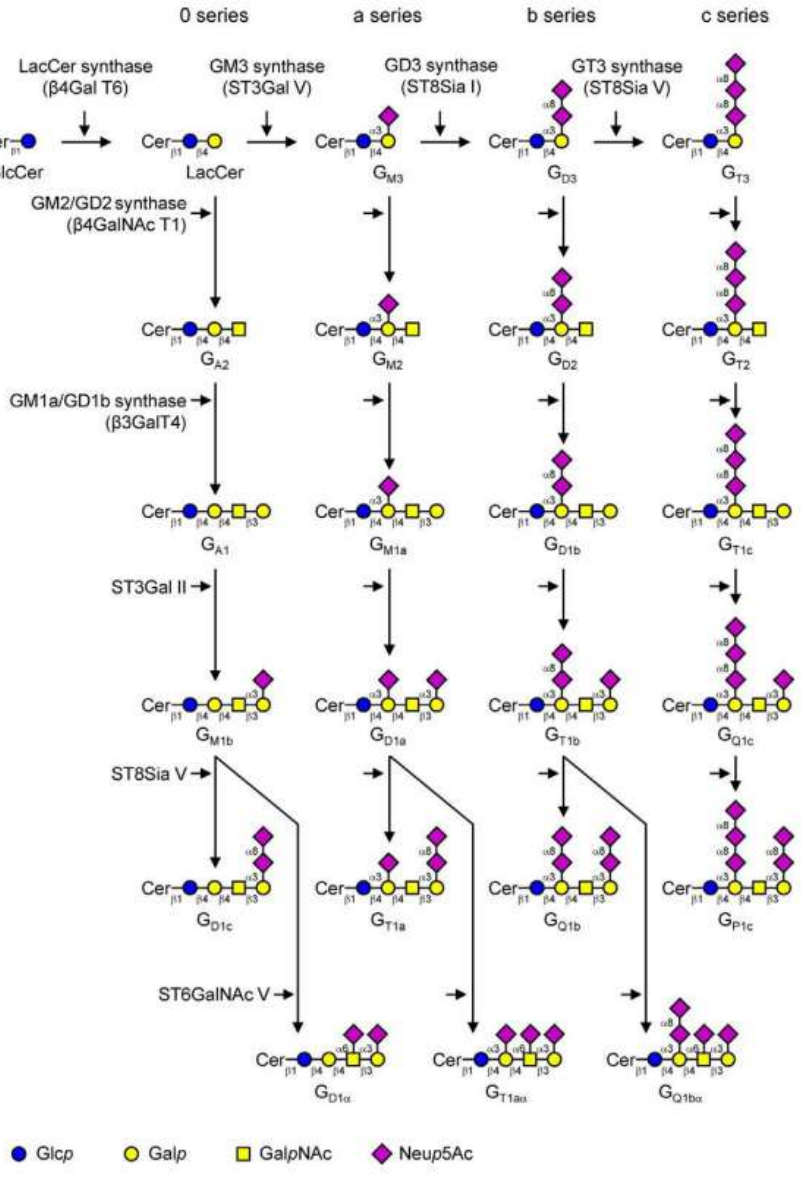


Figure 13. Schéma de la synthèse des gangliosides [151]. Le lactosylcéramide est le métabolite précurseur de la formation de tous les gangliosides. Le nombre de résidus sialiques (motif violet) classifie les gangliosides en 4 séries différentes.

c. Catabolisme du céramide

Le céramide est dégradé par une famille d'enzymes appelée céramidases (CDases). Il en existe 3 types, caractérisés par leur localisation et leur pH optimal d'activité. La céramidase acide (AC), codé par le gène *ASAH1,* est localisée au niveau du lysosome et prendra en charge le céramide issu de la dégradation des sphingolipides complexes. La céramidase neutre, codée par *ASAH2,* se trouve au niveau de la membrane plasmique et utilise le céramide provenant principalement de la dégradation de la sphingomyéline. Et enfin, les céramidases alcalines, codées par 3 gènes *ACER1, ACER2* et *ACER3,* sont retrouvées au niveau du RE et de l'appareil de Golgi [152]. Les CDases déacylent le céramide en sphingosine. La sphingosine pourra d'un côté alimenter à nouveau la synthèse des SLs (Cf 2.a.ii) ou pourra être phosphorylée en sphingosine-1-phosphate par les sphingosines kinases 1 et 2 (SK1 et SK2). La SK1 se retrouve préférentiellement au niveau du cytosol, tandis que la SK2 est plutôt nucléaire [153]. La source principale de production de la S1P provient de la dégradation du céramide par la céramidase neutre au niveau de la membrane plasmique puis la phosphorylation de la sphingosine par la SK1 [154]. La S1P peut alors avoir 3 destins différents : (i) être dégradée de manière irréversible ; (ii) être sécrétée ; (iii) être recyclée en sphingosine. La dégradation irréversible de la S1P en hexadécénal et phosphoéthanolamine se fait exclusivement au niveau du RE par la S1P lyase (SPL) [155]. La sécrétion, quant à elle se fait *via* des transporteurs de la famille ABC ou par Spns2. La S1P pourra alors agir de façon autocrine ou paracrine sur différents récepteurs spécifiques. Le recyclage de la S1P en sphingosine peut se faire au niveau de la membrane par une famille de lipide phosphate phosphatase (LPP1-3) [156] ou au niveau du RE sous l'action d'une S1P phosphatase (S1PPase), dont il existe 2 isoformes [157]. Le recyclage de la S1P en sphingosine à la membrane permet une régulation de la signalisation de la S1P. Dans le RE, le recyclage de la S1P participe, quant à elle, à la voie de sauvetage du céramide. (Figure 12)

d. Altération du métabolisme des sphingolipides chez l'Homme

Des altérations du métabolisme des SLs chez l'Homme peuvent être responsables de pathologies comme les maladies de surcharges lysosomales. Ce sont des maladies génétiques, autosomiques, récessives, liées à des mutations « perte de fonction » d'enzymes impliquées dans la dégradation des SLs. La maladie de Gaucher est la plus fréquente ; elle est due à un déficit de la glucosylcéramidase acide, codée par *GBA1*, se traduisant par une accumulation de GlcCer dans les lysosomes [158]. D'un point de vue symptomatologique, les patients présentent des hépatosplénomégalies et, pour les formes les plus sévères, des atteintes neurologiques. Les stratégies thérapeutiques reposent sur l'enzymothérapie substitutive, basée sur l'administration

de glucosylcéramidase acide recombinante glycosylée (porteuse d'un mannose ou d'un mannose 6-phosphate) et la stratégie de réduction de substrat, par administration d'un inhibiteur de la glucosylcéramide synthase comme le miglustat, l'eliglustat ou le venglustat. Des stratégies de thérapie génique et de chaperon pharmacologique peuvent également être utilisées [159]. D'autres pathologies génétiques chez l'Homme affectent non pas le catabolisme des sphingolipides mais leur biosynthèse. Par exemple, des neuropathies périphériques peuvent être associées à des mutations de SPTLC1 ou de SPTLC2 et à des taux plasmatiques élevés de désoxycéramides, décrits pour être neurotoxiques [160].

3) Le Céramide au cœur de la signalisation cellulaire

Initialement, le céramide, comme tous les autres sphingolipides, était décrit comme lipide ayant un simple rôle structural, notamment au niveau de la membrane plasmique. La composition de la membrane plasmique en sphingomyéline et céramide participe à la rigidité et la perméabilité des membranes, jouant ainsi un rôle sur l'entrée et la sortie de molécules [161], la migration cellulaire [162] ou la formation de vésicules extracellulaires [163]. La découverte, par l'équipe d'Hannun, du cycle de la sphingomyéline, a initié la découverte d'effets biologiques directement associés au céramide. Dans ces expériences, la différenciation de la lignée monocytaire HL-60 induite par la vitamine D3 dépend de l'activation de la nSMase et de la génération subséquente de céramide [164]. La différenciation cellulaire fut donc la première fonction biologique associée au céramide. Depuis, l'activation du cycle de la sphingomyéline en réponse à divers agents de stress (TNF, Fas ligand, chimiothérapies…) contribue à la signalisation intracellulaire à l'origine de divers effets biologiques comme l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire, l'autophagie ou encore l'inflammation.

a. Céramide et apoptose

La première observation d'une implication du céramide dans l'apoptose a été rapportée dans les cellules leucémiques U937. Dans cette lignée, l'apoptose induite par le TNF active l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide. Le rôle causal du céramide a été illustré par l'apparition des mêmes fragmentations à l'ADN que celles observées par l'action du TNF, signe caractéristique de l'apoptose, lors de l'ajout de C2-céramide exogène [165]. Depuis, de nombreuses études sur différentes lignées ont démontré que l'ajout de céramide exogène induisait l'apoptose [166–169]. Ce phénomène a été associé à l'activation par le céramide de protéases de la famille des caspases, notamment la caspase 3 [170]. En effet, l'inhibition de cette caspase reverse l'effet apoptotique de C2-ceramide exogène [171]. De façon logique, le céramide, entraine le clivage de PARP, cible des caspases 3 et évènement majeur dans la

cascade apoptotique [172]. En supplément de l'activation des effecteurs de l'apoptose, le céramide peut parallèlement diminuer l'expression ou l'activation de protéines anti-apoptotiques. Le C2-ceramide est capable d'activer la phosphatase mitochondriale PP2A, entrainant ainsi la déphosphorylation et l'inactivation de Bcl2 [173]. De façon similaire, l'activation de PP2A par le céramide inhibe la voie Akt et diminue l'expression de la protéine cFLIP [174–176]. L'inhibition d'Akt par le céramide a aussi été montrée comme permettant l'activation de la protéine pro-apoptotique BAD [177]. Le céramide peut également activer la protéine kinase C delta (PKCδ) et favoriser son recrutement au niveau mitochondrial, participant de ce fait au relargage du cytochrome c et l'activation de la caspase 9 [178]. A la membrane mitochondriale externe, le céramide retrouve un rôle structural qui reste cependant très fortement lié à ses fonctions biologiques puisqu'il participe à la formation de canaux permettant la libération des différentes molécules pro-apoptotiques [179]. Cette relation structure-fonction peut se retrouver au niveau de la membrane plasmique. En effet, les microdomaines enrichis en céramide montrent un rôle important dans le clustering des récepteurs de mort et donc le déclenchement de l'apoptose [180].

b. Céramide et cycle cellulaire

Plusieurs études ont observé un ralentissement de la prolifération des cellules incubées avec du céramide exogène [181–183]. Plus précisément, le céramide induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S et G2/M. Cela est permis *via* une déphosphorylation de la protéine du rétinoblastome Rb par la phosphatase PP1, dont l'activation peut être induite par le céramide, [181,184] ainsi que par l'augmentation de p21, une protéine inhibitrice des CDK ([182,185]. Le céramide semble également capable d'induire l'expression de p53, connue pour augmenter la transcription du gène p21 et, indirectement, inhiber la phosphorylation de Rb. En effet, il a été observé que l'ajout de C2-céramide sur des cultures de neurones ou de fibroblastes, augmente l'expression de p53 [186,187]. Cette augmentation participerait à l'arrêt du cycle cellulaire induit par le céramide [188] mais n'est pas forcément nécessaire [189]. Une étude récente, a montré que le C16-céramide endogène est un ligand direct de p53. En réponse au stress, la CerS6 est augmentée au niveau du RE et induit une accumulation de C16-céramide. Ce céramide se lie à p53, empêchant son interaction avec son régulateur négatif MDM2. L'accumulation de p53 qui en résulte entraîne sa translocation nucléaire et l'activation transcriptionnelle des protéines de réponse au stress [190].

c. Céramide et autophagie

L'autophagie est un mécanisme mis en place lors de la réponse à un stress, qui peut aboutir à la mort cellulaire en cas d'excès. L'autophagie induite suite à une privation en acide aminé est associée à une augmentation de l'activité aSMase et une accumulation de céramide. Cela entraine l'activation des phosphatases PP2A et PP1 qui, par déphosphorylation, inactivent AKT et mTOR, favorisant la macro-autophagie [191]. L'inactivation d'AKT par le céramide aboutie également à l'augmentation de l'expression de la protéine Beclin-1, inducteur clé de l'autophagie [192]. Toutefois, ce n'est pas la seule voie impliquée puisque l'activation de JNK par le céramide induit de façon similaire l'augmentation de l'expression de Beclin-1 [193]. L'activité de Beclin-1 est inhibée par son association à la protéine Bcl-2, qui en plus de son rôle anti-apoptotique joue également un rôle anti-autophagique [194]. L'activation de JNK par le céramide permet la dissociation du complexe Beclin-1-Bcl-2 via la phosphorylation de Bcl-2 [195]. Finalement, il a été observé que l'accumulation de céramide au niveau du RE induit un stress menant à l'autophagie. En effet, l'inhibition de la CerS2 entraine une accumulation de céramide en C14 et C16 activant à la fois l'autophagie et la réponse UPR (Unfolded Protein Response) [196].

4) Dérégulation du métabolisme du céramide et mélanome

Depuis maintenant plus de 10 ans, la reprogrammation du métabolisme fait partie des fameux « hallmarks of cancer ». Le métabolisme du céramide, riche en lipides bioactifs, impliqué à la fois dans la mort et la survie cellulaire, ne déroge pas à la règle. L'expression des enzymes composant ce métabolisme est modifiée afin de favoriser la production de métabolites pro-tumoraux ou oncométabolite, comme la S1P, et réduire la production de métabolites anti-tumoraux, ou anti-oncométabolite, comme le céramide.

a. Modification de l'expression des enzymes du métabolisme du céramide

En partant de ce postulat, l'expression des enzymes participant au catabolisme ou à la métabolisation du céramide est augmentée, alors que celle des enzymes de la biosynthèse est diminuée (Figure 14). Pour exemple, l'expression des gènes des enzymes participant à la formation de glucosylcéramides et des gangliosides est augmentée dans le mélanome cutané, en comparaison à la peau et aux naevi [197]. A contrario, l'expression de *GBA2*, codant pour la glucosylcéramidase, est diminuée dans différentes lignées de mélanome, en comparaison à des mélanocytes normaux [198]. Ceci est associé à une accumulation de GlcCer et une diminution de céramide dans les cellules tumorales. Étonnamment, la galactosylcérebrosidase

(GALC) qui dégrade le GalCer en céramide, est quant à elle surexprimée au cours de la progression du mélanome. Ceci peut s'expliquer par un mécanisme original, où l'expression de *GALC* est inversement corrélée à celle de *SMPD3,* codant pour la sphingomyélinase neutre 2. En effet, une diminution de GALC par shARN entraine non pas une diminution du réservoir en céramide mais au contraire une accumulation de céramide via l'augmentation subséquente de *SMPD3* [199]. L'augmentation de *GALC* au cours de la progression du mélanome s'accompagne d'une diminution concomitante de *SMPD3* et de la génération de céramide. Une étude indépendante a pu mettre en évidence qu'une faible expression de *SMPD3* est associée à un stade tumoral plus avancé ainsi qu'à un mauvais pronostic [200]. De même, l'expression de la sphingomyélinase acide est aussi inversement corrélée au stade tumoral du mélanome [201]. De façon toute aussi étonnante que pour GALC, la sphingomyéline synthase 1 (SMS1) n'est pas augmentée mais plutôt diminuée dans le mélanome. Cela permettrait d'alimenter la glucosylcéramide synthase, dont l'activité est forte dans les mélanomes, afin d'orienter le métabolisme vers une production de glycosphingolipides [202]. Une analyse de la biosynthèse de céramide sur une variété de lignées de mélanome à des stades d'agressivité différents et une lignée primaire de mélanocyte a confirmé la faible concentration en céramide dans les lignées de mélanome [203]. Ceci n'est pas associé à une augmentation de l'expression de la céramidase acide puisque, bien qu'elle soit augmentée en comparaison à la peau normale, son expression reste identique à celle pouvant être observée au niveau des mélanocytes. La faible concentration de céramide peut toutefois s'expliquer par une diminution des voies de biosynthèses, puisque les lignées de mélanomes présentent une expression en sérine palmitoyltransférase (SPT), première enzyme de la synthèse *de novo*, et en céramide synthase, diminuée en comparaison à une lignée de mélanocytes. En parallèle d'une diminution du taux de céramide, les cellules de mélanome présentent un taux élevé de sphingosine-1-phosphate. Ceci peut s'expliquer par l'augmentation de l'expression de la sphingosine kinase 1 [204]. (Figure 14)

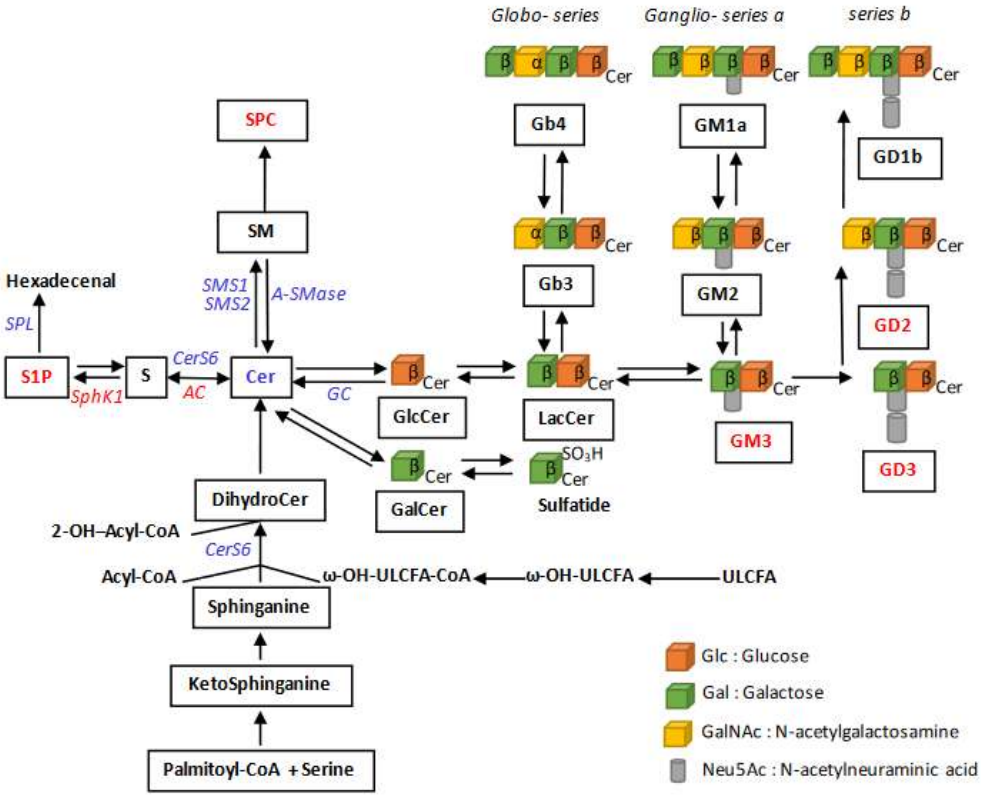


Figure 14. Dérégulations du métabolisme des SLs dans le mélanome [205]. En bleu, les enzymes ou les métabolites diminués dans le mélanome. En rouge, les enzymes ou les métabolites augmentés dans le mélanome. AC, céramidase acide; Cer, céramide; CERS, céramide synthase; CoA, coenzyme A; DihydroCer, dihydrocéramide; GalCer, galactosylcéramide; GC, glucosylcéramidase; GlcCer, glucosylcéramide; LacCer, lactosylcéramide; S, sphingosine; S1P, sphingosine 1-phosphate; SM, sphingomyeline; SMases, sphingomyélinases; SMS, sphingomyeline synthase; SPC, sphingosylphosphorylcholine; SphK, sphingosine kinase; SPL, S1P lyase; ULCFA,acide gras à très longue chaine.

b. Rôle du métabolisme du céramide dans la survie et la prolifération du mélanome

La forte expression de la SK1 dans les cellules de mélanome réduit la sensibilité de ces cellules à l'apoptose médiée par le céramide [206]. Plusieurs études ont démontré par différentes méthodes (siARN ; shARN et inhibition pharmacologique) que l'inhibition de la SK1 permet de réduire la prolifération des cellules de mélanome *in vitro* ainsi que la croissance tumorale dans des modèles murins [207–209]. L'inhibition de la SK1 est associée à une réduction de la production de S1P et une accumulation de céramide. Cela entraine une diminution de l'activation de la voie AKT et de l'expression de la cycline D1, entrainant un arrêt du cycle cellulaire. De plus, l'inhibition de la SK1 sensibilise les cellules à l'apoptose *via* l'activation des caspases 3/7 et le clivage de PARP [207]. Un résultat similaire peut être observé

par l'utilisation d'un antagoniste fonctionnel d'un récepteur à la S1P, le FTY720 [210]. A noter que l'ajout de C2-ceramide exogène diminue la prolifération de la lignée de mélanome Malme-3M *via* une diminution d'AKT [211]. La balance S1P/céramide semble donc déterminante dans la survie et la prolifération du mélanome.

De par son rôle majeur dans la dégradation du céramide, la céramidase acide (AC) travaille de concert avec la SK1 pour favoriser la croissance tumorale. Bien qu'il n'y ait pas de différence d'expression de cette enzyme entre les mélanocytes et les cellules de mélanome, son expression dans les biopsies de mélanome reste tout de même plus élevée que dans une peau saine [203,212]. De plus, il est intéressant de remarquer que l'expression de l'AC est plus forte dans les lignées de mélanome prolifératives que dans les invasives [203,213]. Les cellules de mélanome transfectées avec un shARN ciblant la céramidase acide montrent une croissance tumorale ralentie *in vivo* en comparaison à des cellules sauvages [212]. Un résultat similaire est observé avec l'utilisation du carmofur, un inhibiteur pharmacologique de l'AC. Dans ce travail, l'inhibition de l'AC entraine une augmentation de céramide, permettant l'activation de PPARγ et de la biosynthèse subséquente des peroxysomes. Cela abouti à une augmentation de la production de ROS, inhibant ainsi la progression tumorale. Lai et al ont publié une série de papiers étudiant l'impact de l'ablation complète de la céramidase acide par une technique de CRISPR/Cas9 dans la lignée de mélanome A375 [214,215]. Suite à cette ablation, ils ont observé une augmentation de la concentration de céramide, un arrêt du cycle cellulaire en G1/S, une sénescence accélérée et une augmentation de l'apoptose. De plus, les cellules A375 KO pour la céramidase acide présentent une altération de l'autophagie les rendant plus sensibles à l'apoptose suite à une privation en nutriments. L'expression de l'AC semble donc importante pour la survie des cellules tumorales, surtout lors de la réponse à un stress.

Au-delà de la céramidase acide, de manière générale, d'autres enzymes participant au maintien du réservoir de céramide modulent la progression tumorale du mélanome. En effet, l'expression forcée des sphingomyélinases neutres ou acide ou encore de GBA2, normalement faiblement exprimées dans le mélanome, altère la croissance tumorale [200,201]. Inversement, l'inhibition de la glucosylceramide synthase (GCS) par des méthodes géniques ou pharmacologique diminue cette croissance [216,217].

La reprogrammation du métabolisme du céramide dans le mélanome semble promouvoir la génération de métabolites sphingolipidiques favorisant la prolifération et la survie du mélanome.

c. Impact du métabolisme du céramide sur l'agressivité du mélanome

L'agressivité du mélanome, comme pour tous les cancers, peut se caractériser par sa capacité à former des métastases et à résister aux traitements. Là encore, le métabolisme du céramide semble avoir son rôle à jouer.

i. Effet du métabolisme du céramide sur la formation des métastases

La formation des métastases repose sur les prédispositions d'invasion et de migration des cellules tumorales. Dans un modèle de métastase chez la souris, la S1P peut à la fois activer ou inhiber la migration des cellules de mélanome en fonction des sous-types de récepteurs à la S1P activés. En effet, dans les cellules B16F10, exprimant uniquement le récepteur S1PR2, le pré-traitement de ces cellules à la S1P inhibe la formation de métastase au niveau du poumon. Cela est associé à la fois à l'inhibition de Rac et à la stimulation de RhoA. Cependant, après expression forcée du récepteur S1PR1 sur ces cellules, la S1P active la migration cellulaire [218]. Ces résultats sont validés par l'inversion des effets anti-métastatiques de la S1P par l'utilisation d'un antagoniste sélectif du S1PR2. La surexpression du S1PR1 et S1PR3 inverse également le phénotype, identifiant un rôle pro-migratoire de ces deux récepteurs en réponse à la S1P [219]. De manière intéressante, la surexpression de la SK1 dans les cellules de mélanome, bien qu'augmentant le taux de S1P, n'a pas d'effet sur la migration de ces cellules. Toutefois, la surexpression de la SK1 dans des fibroblastes co-cultivés avec des cellules de mélanome augmente leur potentiel de migration *in vitro* mais également *in vivo* par un mécanisme S1PR3 dépendant [204]. Il semblerait donc que la présence de S1P dans le microenvironnement tumoral contribue à la dissémination du mélanome.

En ce qui concerne la céramidase acide, son expression est plus faible dans les cellules invasives comparées aux cellules prolifératives. De plus, lors d'observations sur des coupes de biopsie tumorale, son expression est plus importante au niveau des sites superficiels qu'au niveau des zones invasives [213]. En accord avec ces observations, des expériences d'interférence ARN diminuant l'expression de l'AC par les cellules de mélanome augmente leurs capacités invasives. En effet, la transfection de cellules de mélanome dites prolifératives, avec un siARN ciblant l'AC (siASAH1), augmente la migration de ces cellules en chambre de Boyden. Cependant, l'effet inverse est observé dans un modèle de métastase où des cellules de mélanome dont l'expression en AC est diminuée par shARN avant injection dans la veine caudale de souris. Dans ce modèle, le développement de métastases au niveau du poumon est réduit [212]. Toutefois, la diminution de l'AC par siARN montre une augmentation de la phosphorylation de FAK, ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'intégrine β5 et αV,

protéines essentielles dans le processus d'extravasation des cellules [220]. Or, les phénomènes d'extravasation ne sont pas observables dans le modèle métastatique d'injection intraveineuse, la diminution des cellules tumorales au niveau du poumon peut donc probablement s'expliquer par une inhibition de la prolifération des cellules suite à l'inhibition de l'AC. La faible expression de l'AC est donc associée à un phénotype plus invasif des cellules de mélanome. Ceci se traduit au niveau des métabolites par une accumulation de céramide et une diminution de sphingosine. En effet, l'ajout de sphingosine exogène inverse l'effet pro-migratoire induit par le siASAH1.

En ce qui concerne le céramide, son accumulation dans les cellules tumorales suite à l'inhibition de la glucosylcéramide synthase [221] ou à l'augmentation de l'expression des sphingomyélinases [199,201] est associé à une diminution des capacités métastatiques des cellules de mélanome. Toutefois, l'injection de B16F10 dans des souris déficientes pour la sphingomyélinase acide résulte en une formation de métastases réduite par comparaison à des souris sauvages [222]. La pré-incubation des cellules de mélanome avec du C16-céramide ou de la aSMase exogène reverse le phénotype. En terme de mécanistique, les cellules de mélanome induisent la sécrétion de aSMase par les plaquettes, entrainant la production de céramide au niveau de la membrane externe des cellules tumorales et ainsi activant les intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$, favorisant l'adhésion des cellules au niveau du site métastatique. Le céramide, malgré des propriétés anti-tumorales, semble participer à l'adhésion des cellules. De plus, le céramide intervient également dans la formation de vésicules extracellulaires [223] qui ont été identifiées comme essentielles à la préparation de la niche métastatique par les cellules de mélanome [224].

Le céramide est également la source de production des gangliosides. Cette famille de sphingolipides complexes est composée de plusieurs sous espèces dont certaines favorisent l'agressivité du mélanome. En effet, la forte présence de GM3 et GD3 est par exemple associée à un mauvais pronostic pour les patients, et à des capacités invasives des cellules tumorales augmentées [225,226]. De même, les GM2 et GD2 semblent favoriser l'angiogenèse et la motilité cellulaire [227]. De plus, le traitement de cellules de mélanome peu agressives par du GM2 ou GM3 entraine une augmentation de leurs capacités métastatiques [228]. Ceci peut s'expliquer par l'étroite relation des gangliosides avec les phénomènes d'adhésion et de production de metalloprotéases, processus clés dans les premières étapes de migration. En effet, le traitement des cellules tumorales par du GD3 entraine l'activation des protéines p300Cas et Paxillin qui s'associent à FAK et Src, participant ainsi à la mise en place des point focaux

d'adhésion et des structures de migration (lamellipodes, filopodes) [229]. Le GD2, quant à lui, s'associe directement avec les intégrines β1. L'inhibition de cette interaction diminue les capacités d'invasion et de prolifération dépendantes de taux élevés de GD2 [230]. Enfin, le GM3 stimule la migration et l'invasion des cellules de mélanome *via* l'activation de uPA et MMP2, deux protéases permettant la dégradation de la matrice extracellulaire [231].

ii. Métabolisme du céramide et résistance aux traitements dans le mélanome

La capacité des cellules tumorales à résister aux traitements fait également partie des caractéristiques d'agressivité du cancer. Classiquement, la première thérapie utilisée dans le mélanome fût la chimiothérapie. Le ratio céramide/S1P semble déterminant dans la réponse aux traitements. La diminution de la céramidase acide ou l'augmentation de la sphingomyélinase acide, entrainant une accumulation de céramide, permet la sensibilisation des cellules tumorales à différentes chimiothérapies [232–234]. De la même manière, l'antagoniste des récepteurs à la S1P, le FTY720, améliore l'efficacité du cisplatin dans une lignée de mélanome résistante [235]. Ainsi, le basculement de la balance céramide/S1P vers le céramide sensibilise les cellules résistantes à l'apoptose. Ceci peut être également observé dans des thérapies plus récentes comme les thérapies ciblées dirigées contre Braf muté. En effet, un faible ratio céramide/S1P est associé à une résistance aux inhibiteurs de Braf dans le mélanome [236]. L'utilisation d'antagoniste des récepteurs à la S1P, l'inhibition de la SK1 ou encore l'utilisation de céramide exogène permet de sensibiliser ces cellules à la thérapie ciblée. De manière intéressante, ce phénomène est associé à une diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. En accord avec ces observations, l'inhibition pharmacologique de la céramidase acide améliore également l'efficacité du vémurafenib (inhibiteur de Braf) *in vitro* et *in vivo* [212]. Enfin, les immunothérapies ciblant les points de contrôle immunitaire sont de nos jours l'une des stratégies thérapeutiques de première ligne dans la prise en charge du mélanome métastatique. Là encore, la balance céramide/S1P semble importante puisqu'à la fois la surexpression de la sphingomyélinase neutre 2 [200] mais également l'inhibition de la SK1 [209] dans les cellules de mélanome semble améliorer l'efficacité des anti-PD-1 et des anti-CTLA-4.

d. Métabolisme du céramide et dédifférenciation du mélanome

La dédifférenciation du mélanome est un processus impliqué à la fois dans la résistance aux traitements et la formation de métastases. Les cellules de mélanome commutent entre différents états allant du plus différencié et prolifératif à l'état le plus dédifférencié et invasif. Une étude récente de multi-omic sur une soixantaine de cellules de mélanome, caractérisant 3

clusters, cellules différenciées, intermédiaires et dédifférenciées, trouve un enrichissement pour la voie du métabolisme des sphingolipides dans le cluster de cellules avec un phénotype intermédiaire [237]. En ce sens, la céramidase acide a été identifiée comme une enzyme cruciale à la transition entre un phénotype prolifératif et invasif [213].

Comme évoqué précédemment, le facteur de transcription MITF est le régulateur clé de ce processus. Or, l'expression de MITF augmente dans les cellules sur-exprimant la céramidase acide. De manière similaire, les cellules de mélanome A375, déficientes pour la céramidase acide, présentent une forte diminution de l'expression de MITF [214]. Réciproquement, une analyse de données de CHIP-Seq a permis d'identifier la céramidase acide comme une cible transcriptionnelle directe de MITF [213]. Il existe donc un lien très étroit entre MITF et le métabolisme du céramide. Il est à noter que la diminution de MITF observée dans les A375 déficientes pour la céramidase acide est associée à une accumulation de céramide saturé à longue chaine [214]. De façon intéressante, plusieurs études associent l'accumulation de céramide avec une réduction de l'expression de MITF. La première observation fut la diminution de l'expression de MITF via l'activation de la voie ERK, dans des mélanocytes humains traités par du C2-céramide exogène [238]. En accord avec ce résultat, il a été démontré dans des lignées murines de mélanome que l'expression de la sphingomyélinase acide entraine la dégradation protéasomale de MITF *via* l'activation de la voie ERK [201]. De la même manière, l'augmentation du ratio céramide/S1P par l'inhibition de la SK1 ou la surexpression de la sphingosine-1-phosphate lyase est associée à une diminution de l'expression de MITF [236].

CHAPITRE 3 : LE FACTEUR DE NÉCROSE TUMORALE OU TNFα

1) Structure, Signalisation et Fonctions Physiologiques

a. Structure

Le facteur de nécrose tumorale (ou TNF) est une cytokine produite majoritairement par les cellules du système immunitaire comme les monocytes/macrophages et les lymphocytes T [239]. Mais son expression a également pu être détectée dans d'autres types cellulaires tels que les fibroblastes [240], les cellules musculaires lisses [241], les astrocytes [242], les kératinocytes [243] et même les cellules tumorales [244].

Initialement, le TNF est codé par le gène *TNF* (ou *Tnf* chez la souris) se situant sur le chromosome 6 pour le TNF humain et sur le chromosome 17 pour le TNF murin, à grande proximité des gènes codant pour les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité [245]. Le gène codant pour le TNF sera transcrit puis traduit en une protéine transmembranaire de type II de 26kDa. Le TNF membranaire (tmTNF) se présente sous forme d'un homotrimère qui peut être libéré sous forme soluble de 17kDa par l'action d'une protéase nommée TACE (TNFα-converting enzyme) [246]. A la fois, le TNF transmembranaire et le TNF soluble sont biologiquement actifs et vont induire des effets biologiques différents *via* la liaison à deux récepteurs distincts : le TNF-R1 (ou CD120a) et le TNF-R2 (ou CD120b).

b. Signalisation du TNF

i. La signalisation du TNF-R1

Le TNF-R1 peut être activé par les deux formes du TNF ; il est exprimé de manière ubiquitaire, et est responsable de la majorité des effets biologiques liés au TNF. Contrairement au TNF-R2, ce récepteur possède au niveau cytoplasmique un domaine de mort, dont l'activation peut déclencher l'apoptose des cellules [247]. Les récepteurs au TNF ne possèdent pas de domaine intracellulaire à activité enzymatique intrinsèque, la fixation du ligand au récepteur s'accompagne du recrutement d'un réseau riche et complexe de protéines adaptatrices et d'enzymes. A l'état basal, la protéine SODD (Silencer Of Death Domain) est associée au domaine de mort du récepteur, prévenant ainsi son activation constitutive [248]. La liaison du TNF au TNF-R1 entraine son oligomérisation permettant la libération de SODD et le recrutement de la protéine adaptatrice TRADD (TNF-R1-associated death domain) au niveau

du domaine de mort du récepteur [249]. TRADD recrute ensuite la protéine TRAF2 (TNFR-associated factor 2) [250] et la kinase RIPK1 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1) [251]. TRAF2 sert de plateforme pour le recrutement des protéines inhibitrices de l'apoptose cIAP1/2 (cellular inhibitor of apoptosis 1 or 2) [252]. Ces 3 protéines sont des E3 ubiquitine ligase qui activent RIPK1. L'état d'ubiquitination de RIPK1 est déterminant sur le type de complexe formé en aval du récepteur et les conséquences de l'activation du TNF-R1. En effet, l'activation de ce récepteur aboutie soit à la stimulation de voies de survie (dépendantes du complexe I), comme p38/MAPK, JNK ou NF-κB, soit au déclenchement de l'apoptose (dépendante du complexe II). (Figure 15)

Classiquement, RIPK1, ubiquitinylée de façon linéaire, entraine la formation du complexe I par le recrutement du complexe protéique LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex). Ce complexe permet de stabiliser le complexe I par l'ajout d'une chaîne d'ubiquitine supplémentaire sur RIPK1 [253]. Cet évènement est également nécessaire pour le recrutement de TAK1 (TGFβ-Activated protein 1) et du complexe NEMO (NF-κB essential modulator). A son tour la liaison de NEMO à la chaîne poly-ubiquitinée permet le recrutement des kinases IKKα et IKKβ et termine ainsi la formation du complexe IKK [254,255]. La phosphorylation par TAK1 de IKKβ active ce complexe, qui phosphoryle ensuite I-κBα, le répresseur cytoplasmique du facteur de transcription NF-κB. I-κBα phosphorylée est dégradée par le protéasome et permet la translocation vers le noyau de NF-κB, activant ainsi la voie canonique de cette signalisation. Parallèlement à l'activation du complexe IKK, TAK1 peut également phosphoryler et activer des MAPKKs qui à leur tour activent les kinases JNK et p38 [256,257]. La formation du complexe I entraine donc l'activation des voies NF-κB, JNK et p38/MAPK, impliquées dans la survie, la prolifération et l'inflammation. (Figure 15)

Une ubiquinylation incomplète de RIPK3 aboutie à la formation des complexes IIa ou IIb menant à la mort cellulaire [258]. RIPK3 peut être déubiquitynilée par la protéine CYLD menant ainsi au détachement de RIPK3 du complexe I et à la formation d'un complexe Iia, cytosolique, résultant de l'association des protéines TRADD, FADD (Fas-associated death domain), $FLIP_L$ (FLICE-like inhibitory protein) et la pro-caspase 8. La formation de ce complexe entraine l'activation autocatalytique de la pro-caspase 8, caspase initiatrice l'apoptose. Le complexe IIb possède la même association de protéines à l'exception de TRADD et mène également à l'apoptose. La formation du complexe IIa est déclenchée par la dégradation des protéines cIAP1/2 par les SMACs (second mitochondria-derived activator caspase) causant

ainsi une ubiquitination incomplète de RIPK3 et une déstabilisation du complexe I [259]. (Figure 15)

Enfin, un troisième type de complexe peut être formé suite à l'activation du TNF-R1, le complexe IIc qui mènera à la mort par nécroptose. Suite à l'activation des caspases par la formation des complexes II, RIPK1 et RIPK3 vont être dégradées [260]. Si cela n'a pas lieu, ces deux protéines forment un agrégat nommé nécrosome [261], phosphorylant ainsi la protéine MLKL (mixed-lineage kinase domain-like protein). MLKL phosphorylées s'agrègent et transloquent à la membrane où elles forment des pores, augmentant la perméabilité membranaire et conduisant à la lyse cellulaire [262]. Ainsi, la nécroptose se définit comme une forme de nécrose programmée ou régulée. (Figure 15)

L'activation de la signalisation du TNF-R1 peut favoriser la survie des cellules ou, à l'opposé, induire la mort programmée. L'état d'ubiquitinylation de RIPK mais également la disponibilité des caspases sont cruciaux pour déterminer la destinée cellulaire. Par défaut, l'activation du TNF-R1 va plutôt favoriser la mise en place des voies de survie. Ceci est permis par l'expression de protéines anti-apoptotiques comme les cIAPs ou cFLIP [263]. Dans les cellules résistantes à l'apoptose, ces protéines sont fortement exprimées et leur expression peut être induites par l'activation de la voie NF-κB [264,265]. Ainsi, une défaillance dans l'activation de cette voie conduit à la diminution de l'expression de ces protéines anti-apoptotiques et de l'activation de NF-κB, favorisant ainsi l'induction de l'apoptose [266]. De plus, l'apoptose survient la plupart du temps suite à des stimuli permettant l'expression de protéines pro-apoptotiques telles que Smac/DIABLO, permettant l'inhibition des IAPs et l'orientation de la signalisation TNF-R1 vers la formation du complexe II [259,267]. (Figure 15)

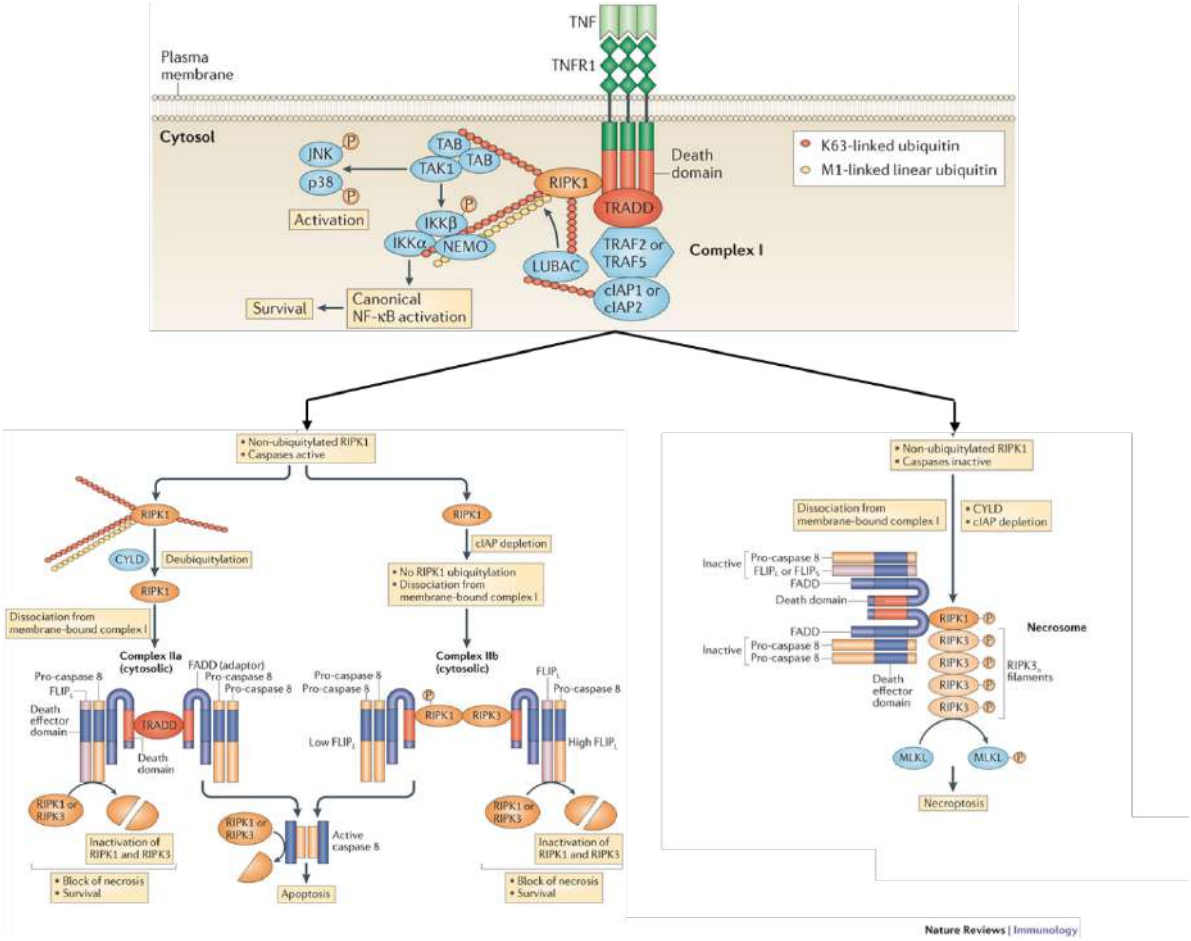


Figure 15. Signalisation du TNF-R1 [268]. La liaison du TNF au niveau du TNF-R1 entraine le recrutement de diverses protéines comme TRADD, TRAF2, les cIAPs et RIPK1 au niveau du domaine de mort du récepteur. L'état d'ubiquitinylation de RIPK1 dicte la formation du complexe I et ainsi l'activation de voie de survie tel que NF-κB ou la formation des complexes II menant à la mort programmée des cellules. La disponibilité des caspases peut également orienter la signalisation vers la formation du nécrosome, et aboutir à la nécroptose.

ii. La signalisation TNF-R2 dépendante

Le TNF-R2, contrairement au TNF-R1, n'est exprimé que par quelques types cellulaires : les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules immunitaires. Il peut, à l'instar du TNF-R1, lier les deux formes du TNF, mais avec une affinité plus forte pour la forme transmembranaire du TNF [269]. De plus, l'une des grandes différences structurales avec le TNF-R1 réside dans l'absence de domaine de mort dans la partie intracellulaire de ce récepteur. Par conséquent, l'activation du TNF-R2 a longtemps été associée à la survie et la prolifération cellulaire. En effet, la liaison du TNF au TNF-R2 entraine l'activation de la voie non canonique de NF-κB *via* le recrutement direct de TRAF2 et TRAF1 ou 3 au niveau de la partie cytoplasmique du récepteur. Cet assemblage permet ensuite le recrutement de la MAPKK kinase NIK, qui phosphoryle I-κB, permettant la translocation nucléaire de NF-κB [270]. Le

TNFR2 peut également *via* le recrutement de TRAF2, activer la voie canonique de NF-κB *via* la mise en place du complexe I, de manière comparable au TNF-R1. En parallèle de ces voies de survie classiques, de façon originale, le TNF-R2 est associé de manière constitutif, à une protéine kinase nommée Etk/Bmx, qui en réponse au TNF participerait à l'adhésion, la prolifération et la survie des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse [271].

En l'absence de domaine de mort, l'activation du TNF-R2 n'induit pas directement la mise en place de l'apoptose. Cependant des études démontrent qu'il existe une coopération entre la signalisation TNF-R1 et la signalisation TNF-R2 aboutissant à la mort programmée des cellules. Le TNF-R2 permettrait la diminution de la concentration de TNF nécessaire à son action cytotoxique par un système de transmission du ligand au TNF-R1 [272]. De plus, des études ont observé qu'il existe une compétition des deux signalisations pour le recrutement de TRAF2 et des IAPs. Le TNF-R2 induit la dégradation de ces protéines, favorisant ainsi l'orientation de la signalisation TNF-R1 vers la formation du complexe II et donc la mort cellulaire [273,274].

c. Fonctions Physio(patho)logiques

i. Fonctions physiologiques

Le TNF a été découvert en 1975 par Carswell et al. pour sa capacité à induire la nécrose de fibrosarcomes cutanés. Depuis, diverses fonctions biologiques ont été attribuées au TNF, notamment son rôle dans l'apoptose, l'inflammation et la réponse aux pathogènes.

Le TNF est une cytokine pro-inflammatoire dont les effets sur le système immunitaire sont pléiotropes. Il participe à l'activation, la prolifération, la maturation et le chimiotactisme de nombreuses cellules immunitaires. De par son action pro-apoptotique, il fait également partie de l'arsenal cytotoxique de certaines populations immunitaires telles que les Natural Killers (NK) [275] et les lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) [276].

Le développement des souris déficientes pour le TNF, le TNF-R1 et le TNF-R2, a permis d'identifier les processus physiologiques clés dépendants du TNF. Pasparakis et al ont observé chez des souris TNF KO et TNF-R1 KO, une altération de la structure et de l'organisation des follicules lymphoïdes B spléniques et un défaut du développement des centres germinatifs après immunisation [277]. A cause de ce défaut structural, la production d'anticorps spécifiques en réponse à un antigène thymo-dépendant se retrouve diminuée. La signalisation TNF joue donc un rôle important dans le développement de l'immunité à médiation humorale. De plus, le TNF

joue un rôle primordial dans la réponse immunitaire anti-infectieuse. En comparaison aux souris sauvages, les souris déficientes pour le TNF ou ses récepteurs sont plus sensibles à l'infection par divers pathogènes d'origine bactérienne ou fongique (Tableau 2). De plus, la production par le virus du fibrome de Shope, d'un récepteur soluble du TNF lui permettant de contourner les défenses de l'hôte, renforce le rôle de cette cytokine dans la réponse immunitaire anti-virale [278]. En effet, le TNF, en association avec les IFN (α/β et γ), participe à la mise en place d'une réponse immunitaire anti-virale optimale, en réprimant l'expression de gènes viraux et la réplication virale [279].

Pour résumer, physiologiquement, le TNFα est important pour une bonne homéostasie immunitaire et la mise en place d'une réponse immune efficace contre les infections, cependant une production inappropriée et excessive de cette cytokine peut entrainer le développement de pathologie inflammatoire sévère.

Pathogènes	Modèle de souris	Références
Listeria Monocytogènes	Anti-TNF	Nakane et al. 1988 [280]
Listeria Monocytogènes	TNF-R1 KO	Rothe et al. 1993 [281]
Listeria Monocytogènes	TNF-R1 KO	Pfeffer et al 1993 [282]
Listeria Monocytogènes	TNF KO	Pasparakis et al. 1996 [277]
Listeria Monocytogènes	TNF-R1/ TNF-R2 KO	Peschon et al., 1998 [283]
Mycobacterium Tuberculosis	TNF KO/ TNF-R1 KO	Jacobs et al. 2007 [284]
Candidas albicans	TNF-R1/ TNF-R2 KO	Steinshamn et al. 1996 [285]
Candidas albicans	TNF KO	Marino et al. 1997 [286]
Toxoplasma gondii	TNF KO, TNF-R1 KO, TNF-R2 KO	Korner et al. 2010 [287]

Tableau 2. Une déficience dans la signalisation TNF sensibilise à l'infection par divers pathogènes.

ii. Fonctions pathologiques

En réponse au lipopolysaccharide (LPS) présent sur les bactéries à Gram-, la production excessive de TNF par les macrophages peut entrainer une forte inflammation menant au choc septique [239]. Bien que sensibles à l'infection par certains pathogènes, les souris déficientes pour la signalisation TNF montrent une résistance aux effets délétères du LPS [281,282]. Il a d'ailleurs été montré que l'immunisation de souris ou encore de babouins contre le TNF, protégeait ces animaux d'un choc septique induit par l'injection d'une dose létale de *E.coli*

[288,289]. De manière intéressante, une étude démontre que la résistance de souris TNF-R1 et R2 déficientes à l'injection IP de bactéries est associée à une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires au sein de la cavité péritonéale [290]. Le TNF semble donc être médiateur dans la mise en place d'une inflammation qui peut être délétère pour l'organisme.

L'inflammation chronique peut aboutir au développement de maladie inflammatoire auto-immune. L'infiltration des tissus par les cellules immunitaires et la production excessive de cytokines pro-inflammatoires au niveau des tissus entrainent leur destruction. Le TNF a été identifié comme impliqué dans le développement de bons nombres de maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, la maladie de Crohn et d'autres maladies inflammatoires du côlon (pour revue, [291]). De manière générale, dans ces différentes maladies, le TNF produit par les lymphocytes T activés ou les macrophages, entraine la dégradation de la matrice extracellulaire *via* l'induction de la sécrétion de metalloprotéases par des cellules du microenvironnement comme les fibroblastes ou les kératinocytes. Le TNF participe aussi au recrutement et à l'activation des cellules dendritiques qui vont alimenter le microenvironnement inflammatoire *via* la sécrétion de diverses cytokines pro-inflammatoires. Finalement, le TNF est également capable de moduler les fonctions immunosuppressives des lymphocytes T régulateurs, population immunitaire clé dans le contrôle des maladies auto-immunes [292].

2) TNF et cancer

Le TNF joue un rôle dual dans le cancer, notamment *via* sa capacité à moduler la réponse immunitaire antitumorale. Ainsi, le TNF stimule la diapédèse des leucocytes, la maturation des cellules dendritiques et contribue à l'activité cytotoxique des cellules NK et des CTL. A l'opposé, le TNF a été montré comme facilitant la survie et l'activité immunosuppressive des Treg, des MDSC et des Breg. De plus, le TNF induit la mort cellulaire par activation (AICD) des lymphocytes T CD8, limitant l'infiltration des tumeurs par les CTL. D'autre part, le TNF facilite l'augmentation de l'expression de molécules immunosuppressives comme PD-L1 et CD73. Enfin, le TNF induit la dédifférenciation des cellules de mélanome, associée à une perte d'expression d'antigènes mélaniques, contribuant à la résistance des mélanomes aux CTL dans des protocoles de thérapies adoptives.

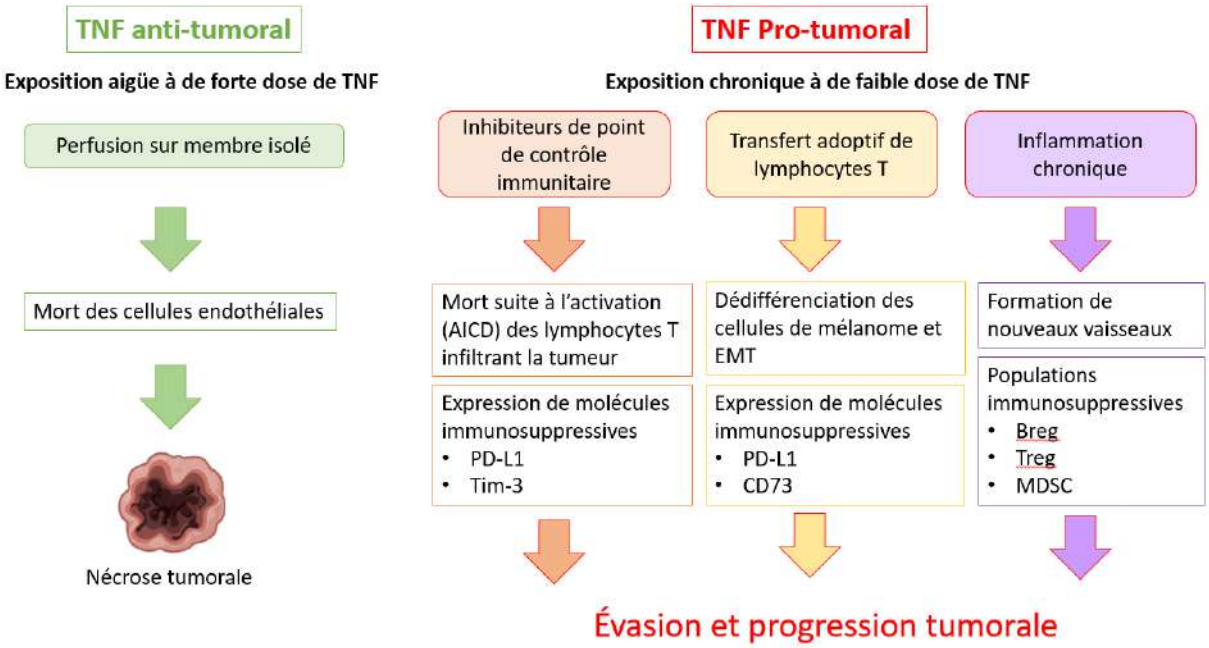


Figure 16. Rôle du TNF dans le cancer. Une forte exposition au TNF induit la nécrose tumorale. Cependant plusieurs études montrent que l'exposition à de faibles taux de TNF de manière chronique est impliquée dans la résistance aux immunothérapies et à la mise en place d'un environnement immunosuppressif. En effet, le TNF induit à la fois la mort suite à l'activation des lymphocytes T infiltrant la tumeur, la transition epithélio-mesenchymateuse des cellules cancéreuses et l'expression de molécules immunosuppressives tels que PD-L1, Tim-3 ou CD73 [293,294]. Le TNF a également des effets pro-angiogéniques et participe au recrutement et à l'activation de populations immunosuppressives. Adapté de [295].

a. Rôle anti-tumoral du TNF

i. La nécrose tumorale induite par le TNF

Comme son nom l'indique, le TNF a été initialement découvert pour sa capacité à induire la nécrose tumorale. En effet, Carswell et al. ont observé dans le sérum de souris injectées par le bacille de Calmette et Guérin puis par le LPS, la présence d'un facteur capable d'induire la nécrose de fibrosarcome, sans avoir d'effet toxique sur des fibroblastes sains [296]. Dans cette même étude, l'injection de sérum contenant du TNF chez la souris induit la nécrose de fibrosarcomes cutanés. Quelques années plus tard, Pennica et al. clone et purifie le TNFα humain et confirme dans un modèle murin de sarcome induit par méthylcholantrène sa capacité à induire la nécrose hémorragique des tumeurs [297]. Cela ouvra la voie à l'utilisation du TNFα comme agent anticancéreux. Les premiers essais cliniques débutèrent en 1987, avec l'injection en systémique de TNF recombinant chez des patients atteints de divers cancers avancés. Malheureusement, ces premiers essais démontrèrent une forte toxicité de l'injection systémique du TNF et une efficacité anti-tumorale faible [298,299]. Afin d'éviter ces effets indésirables

systémiques, un protocole d'injection plus localisé de TNF par perfusion sur membre isolé (ILP) a été mis au point notamment chez les patients atteints de sarcome et de mélanome [300].

ii. Perfusion sur membre isolé et angiogenèse

La première étude clinique utilisant l'injection par ILP de TNF en combinaison avec une chimiothérapie au Melphalan a démontré une efficacité anti-tumorale spectaculaire avec peu d'effets secondaires systémiques chez les patients [301]. Des études mécanistiques chez le rat, ont montré que les effets bénéfiques anti-tumoraux du TNF ne sont pas directs sur les cellules tumorales mais *via* un effet sur la vascularisation des tumeurs. Chez les rats traités par TNF seul ou chimiothérapie seule, aucun effet sur la progression tumorale n'est observé. Alors que la combinaison induit une régression complète des tumeurs *in vivo*. Ce phénomène n'a pas pu être observé sur des cellules tumorales *in vitro*, suggérant un impact du TNF sur les cellules du microenvironnement [302,303]. Dans un premier temps, la forte dose de TNF amenée dans la tumeur par ILP va, de par son effet cytotoxique sur les cellules endothéliales, augmenter la perméabilité des vaisseaux et permettre une meilleure diffusion de la tumeur des molécules de chimiothérapies. Puis, dans un second temps, le TNF entrainera sélectivement la destruction des vaisseaux associés à la tumeur (TAV) aboutissant à la nécrose tumorale [304,305]. Ce phénomène avait d'ailleurs pu être observé dans la première étude effectuée chez l'Homme, où post-traitement combinant TNF et chimiothérapie par ILP, les TAVs avaient complétement disparus tout en préservant les vaisseaux normaux [301]. (Figure 16)

iii. Le TNF, une cytokine clé de la réponse immune anti-tumorale

Il a été démontré que le TNF est capable de réguler la réponse immunitaire anti-tumorale. Des souris déficientes pour le TNF (TNF KO) sont plus susceptibles de développer des sarcomes après exposition au 3′-methylcholanthrene que des souris sauvages [306]. De plus, toujours dans un modèle murin de sarcome, des chercheurs ont observé plus précisément que la nécrose tumorale induite par l'injection de TNF recombinant n'avait plus lieu chez des souris immunodéficientes en cellules T [307]. Une étude plus récente montre que la réponse anti-tumorale des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de la tumeur est altérée chez des souris TNF KO développant un carcinome pulmonaire de Lewis. Cependant, *in vitro*, ces lymphocytes maintiennent leurs capacités de reconnaissance et de lyse de la tumeur, suggérant un effet indirect du TNF sur leur activité anti-tumorale. Dans la réponse anti-tumorale, les lymphocytes T régulateurs jouent un rôle crucial dans la régulation des effets effecteurs des CTLs. De par leur pouvoir immunosuppresseur, leur présence dans la tumeur est associée à une

réponse immunitaire moins efficace et permet l'évasion tumorale [308]. Physiologiquement, cette population permet le maintien de l'homéostasie immunitaire et leur dysfonctionnement peut entrainer l'apparition de maladie auto-immune. De manière intéressante, les maladies auto-immunes sont associées à une forte inflammation, et donc une forte présence de TNF. Dans ce contexte, il a été observé dans un modèle d'arthrose rhumatoïde, que de forte dose de TNF diminue les capacités immunosuppressives des Tregs via l'activation du TNF-R2 [309]. Dans un contexte tumoral, l'inactivation des Tregs par le TNF pourrait améliorer la réponse effectrice des CTLs.

D'autres études suggèrent que le TNF serait également capable de moduler la réponse anti-tumorale immunitaire innée. Cette réponse fait intervenir principalement 2 types de population, les cellules Natural Killer (NK), qui possèdent des fonctions effectrices similaires aux CTLs, et les monocytes/macrophages, qui mettent en place un microenvironnement inflammatoire nécessaire au recrutement et l'activation des populations effectrices. En étudiant l'effet cytotoxique des NK sur diverses lignées cancéreuses, Kashi et al. ont identifié le TNF comme un composant essentiel de l'arsenal cytotoxique des NK [310]. En accord avec ce concept, des NK isolés de souris TNF KO ont une activité cytotoxique anti-tumorale diminuée comparée à des NK provenant de souris sauvages. Ces NK déficients récupèrent leur activité cytotoxique lorsque les souris TNF KO sont traitées avec du TNF recombinant. A noter qu'une observation similaire a été faite pour les CTL [311]. Ces résultats ont été confirmés dans une étude récente, où un screening par librairie CRISPR sur la lignée cancéreuse MC38 (carcinome du colon) a identifié une perte de la signalisation TNF comme mécanisme d'évasion à la réponse anti-tumorale des CTL et NK. Cette étude suggère également que le TNF est une cytokine cruciale pour les fonctions effectrices de ces deux populations [312].

Concernant les macrophages, il a été découvert que le TNF recombinant est capable non seulement d'activer cette population [313] mais également d'empêcher leur conversion vers un phénotype immunosuppresseur et pro-tumoral (macrophage de type M2). En effet, via la signalisation TNF-R1, le TNF réprime directement l'expression des gènes responsables de la mise en place du phénotype M2, mais également supprime la sécrétion de cytokines pro-M2 par les éosinophiles [314]. D'autre part, il a été observé dans un modèle murin de myélome que le TNF serait capable de recruter les macrophages au niveau de la tumeur *via* un mécanisme TNF-R2 dépendant. Une fois dans la tumeur, en réponse au TNF, ces macrophages secrètent de l'oxyde nitrique, désorganisant ainsi l'angiogenèse tumorale et ralentissant la croissance tumorale [315]. Il est à noter que les macrophages activés sont réciproquement de grands

producteurs de TNF, et une partie de leurs actions anti-tumorales passe par la sécrétion de cette cytokine [316].

iv. Immunothérapies et TNF

De par son fort lien avec le système immunitaire, des stratégies thérapeutiques combinant TNF et immunothérapie ont été développées. De nos jours, plusieurs stratégies d'immunothérapies sont utilisées dans le traitement du cancer avec notamment les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (ICI), le transfert adoptif de lymphocytes T (ACT), les vaccins anticancéreux, ou encore les virothérapies. Différentes études montrent l'augmentation de l'efficacité de ces traitements lorsqu'ils sont combinés à l'injection de TNF. En effet, l'injection d'un peptide de fusion assemblant TNF et la chaine variable d'un anticorps ciblant la fibronectine (F8-TNF), permettant une distribution tumorale du TNF, favorise l'efficacité d'un vaccin anticancéreux dans le cancer du côlon [317]. De plus, dans un modèle murin de cancer de la prostate et de mélanome, l'utilisation d'un peptide de fusion NGR-TNF permettant le ciblage du TNF vers les TAVs améliore l'efficacité de la combinaison d'ACT et d'ICI *via* une meilleure infiltration des CTLs [318,319]. Des effets similaires ont été observés dans le mélanome traité avec un adénovirus oncolytique codant pour le TNF et l'IL2 en combinaison avec des anti-PD-1 (ICI) [320]. Toutefois, dans la plupart de ces études, les effets directs du TNF restent limités et semblent plutôt dépendre d'un effet sur les cellules endothéliales permettant une meilleure infiltration des cellules immunitaires dont l'activation sera ensuite améliorée par les différentes immunothérapies.

Pour conclure, bien que les propriétés anti-tumorales du TNF ont permis de développer des stratégies intéressantes dans le traitement des cancers, les effets du TNF restent limités et ne peuvent s'appliquer qu'à des traitements « locaux/régionaux » en raison des effets toxiques importants provoqués par l'injection systémique de TNF. De plus, la découverte de la production de TNF par les cellules tumorales elles-mêmes, suggère un rôle dual du TNF dans la progression tumorale.

b. Rôle pro-tumoral du TNF

i. Premières découvertes des fonctions pro-tumorales du TNF

A la fin des années 80, au milieu de la multitude d'études démontrant les effets anti-tumoraux du TNF, Spriggs et al. font la découverte surprenante que la stimulation d'une lignée de carcinome mammaire par du TNF, induit la production de TNF par cette même lignée. A noter qu'une exposition chronique au TNF de cette lignée entraine également une résistance à

ses effets cytotoxiques [244]. De la même manière, il a été observé que le TNF produit par des cellules leucémiques myéloïdes issues de patient favorise la prolifération de ces mêmes cellules *via* un effet autocrine [321]. Ces premières études initient un questionnement sur un potentiel rôle pro-tumoral du TNF. La production de TNF par les cellules cancéreuses a été par la suite confirmée *in situ* chez l'humain, dans des biopsies de cancer de l'ovaire, par le laboratoire de Fran Balkwill, équipe pionnière dans la découverte du rôle pro-tumoral du TNF [322,323]. De manière intéressante, dans cette étude, il a également été observé que la quantité en ARNm codant pour le TNF dans les tumeurs ovariennes corréle positivement avec le grade tumoral. Depuis, des études dans différents cancers ont établi une corrélation positive entre le taux plasmatique de TNF et la gravité de la maladie [324–327]. Il a d'ailleurs été montré que le TNF à faible concentration favorise la formation de métastase dans un modèle de fibrosarcome murin [328]. L'observation dans les souris TNF KO de l'apparition moins fréquente de tumeurs cutanées après exposition à un carcinogène est un argument qui renforce l'hypothèse d'un rôle pro-tumoral du TNF [329]. Depuis de nombreuses études ont rapporté les effets pro-tumoraux du TNF dans différents types de cancers [330–334].

ii. Le rôle pro-angiogénique du TNF

L'implication du TNF dans la formation des métastases peut être expliquée par les effets pro-angiogéniques du TNF à faible dose. En effet, paradoxalement aux effets anti-angiogéniques du TNF à forte dose, de faible dose le TNF semble activer la formation de nouveaux vaisseaux *in vivo* [335,336]. Plus particulièrement, le travail de Li et al. montre que la production de faible taux de TNF de manière chronique par des cellules murines de mélanome, de carcinome pulmonaire et de carcinome mammaire, promeut la croissance tumorale en favorisant la vascularisation tumorale.[337] Les auteurs décrivent un mécanisme original où le TNF induirait la différenciation des cellules progénitrices myéloïdes en cellules biphénotypiques, exprimant à la fois des marqueurs myéloïdes et endothéliaux. Ces cellules biphénotypiques participeraient ensuite à la néovascularisation tumorale. Il semblerait donc que des concentrations physiologiques de TNF favorisent la progression tumorale par opposition aux doses supra-physiologiques utilisées dans les thérapies anti-tumorales.

iii. Effets du TNF sur les cellules tumorales

Le TNF n'a pas pour seul effet d'agir sur l'angiogenèse, il peut agir à différents niveaux, directement sur les cellules tumorales. Au niveau génétique, le TNF à un fort potentiel mutagène et participe à la transformation et à l'immortalisation de cellules cancéreuses

[338,339]. En termes de mécanistique, le TNF peut induire l'expression d'enzyme capable d'éditer l'ADN ou l'ARN [340] ou encore peut induire la production de ROS [341] à l'origine de dommages à l'ADN. Le TNF intervient aussi au niveau phénotypique, plus particulièrement dans l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). L'EMT est un mécanisme associé à l'agressivité tumorale de par notamment l'acquisition d'un phénotype invasif par les cellules cancéreuses mais aussi de par son implication dans la résistance aux traitements [342]. Dans divers cancers d'origine épithéliale, comme par exemple le cancer du sein [343], les carcinomes rénaux [344] et les hépatocarcinomes [345](32319631), le TNF fait partie des cytokines déclenchant ce phénomène. Ces observations donnent une explication supplémentaire aux effets pro-métastatiques induits par le TNF. De manière intéressante, il a pu être observé que l'EMT induite par le TNF entraine également l'expression par les cellules cancéreuses de molécules immunosuppressives comme le ligand de PD-1, PD-L1, ou l'ectonucléotidase CD73, deux acteurs inhibant la réponse immunitaire anti-tumorale [345]. (Figure 16)

iv. TNF et dédifférenciation du mélanome

Dans le mélanome, nous avons vu qu'un mécanisme similaire à l'EMT, désigné comme la dédifférenciation du mélanome, peut se mettre en place (Cf Chapitre 1.3). Landsberg et al ont découvert dans un modèle murin de transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques des cellules de mélanome, que la production de TNF dans la tumeur était responsable de la mise en place de la dédifférenciation de ces cellules, permettant ainsi aux tumeurs de résister aux traitements [113]. Le même groupe décrivit quelques années plus tard que la dédifférenciation induite par le TNF dans ce contexte se déclenche *via* l'activation de c-JUN qui réprime ensuite l'expression de MITF, facteur de transcription clé de la différenciation [346]. De manière similaire, une autre étude démontre que le TNF est capable de diminuer l'expression de MITF *via* l'activation de l'axe c-myc/BRN2 [347]. Tout comme l'EMT induite par le TNF, la dédifférenciation du mélanome dépendante du TNF est associée à une augmentation de l'expression par les cellules cancéreuses de PD-L1 et de CD73 [293,294]. (Figure 16)

v. Rôle pro-tumoral de la signalisation TNF-R1

De manière générale, la plupart des effets pro-tumoraux du TNF semble être médiés principalement par l'activation du TNF-R1. En effet contrairement au TNF-R2 dont l'expression semble limitée aux cellules immunitaires, le TNF-R1 est exprimé de façon ubiquitaire. De la même façon que les souris TNF KO montrent une résistance à la formation

de tumeurs après exposition à un carcinogène chimique, les souris TNF-R1 KO et TNF-R2 KO développent moins de tumeurs comparées aux souris sauvages [348]. A noter toutefois, que les souris TNF-R2 KO sont remarquablement plus sensibles au carcinogène que les souris TNF-R1 KO. De plus, des études montrent que la formation de métastases pulmonaires et hépatiques est réduite chez les souris TNF-R1 KO. Cela confirme le rôle prépondérant de la signalisation TNF-R1 dans les effets pro-tumoraux du TNF, sans cependant écarter un rôle de la signalisation TNF-R2.

En aval du récepteur TNF-R1, on retrouve le cofacteur TRAF2. L'inhibition de ce cofacteur sensibilise les cellules tumorales aux effets cytotoxiques du TNF en réorientant la signalisation vers l'activation de l'apoptose RIPK1 dépendante [349]. La formation du complexe I semble donc médiée les effets pro-tumoraux du TNF. En ce sens, la signalisation NF-κB également en aval du TNF-R1, a elle-même été identifiée comme cruciale dans la médiation des effets pro-tumoraux des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF [350]. Cette signalisation est d'ailleurs essentielle pour l'induction de l'EMT par le TNF. En effet, à la fois dans un modèle de cancer du sein [343] et un modèle de cancer hypopharyngien [351], la translocation nucléaire de NF-κB p65 suite à la stimulation des cellules par du TNF est nécessaire à l'activation de TWIST1, un facteur de transcription majeur de l'EMT. Toutefois, ce n'est pas l'unique signalisation impliquée puisqu'une activation de la voie PI3K/AKT [344] ou encore de la voie non canonique de NF-κB [352] a pu être observée lors de l'EMT induite par le TNF. Pour finir, l'activation de NF-κB a été identifiée comme primordiale dans la stabilisation de l'expression de PD-L1 médiée par le TNF [353].

vi. <u>Signalisation TNF-R2 et immunosuppression</u>

Le TNF-R2, quant à lui, est préférentiellement exprimé par les cellules immunitaires. Malgré un rôle moins prépondérant que son homologue le TNF-R1, de plus en plus d'études attribuent au TNF-R2 certains effets pro-tumoraux du TNF, notamment les effets immunosuppresseurs. Pour exemple, dans un modèle de cancer du poumon, une étude a identifié une sous population de Treg associée à la tumeur, exprimant le TNF-R2, et dont l'activité immunosuppressive dépasse celle des Treg n'exprimant pas le TNF-R2 [354]. Plusieurs études dans le contexte de maladie auto-immune supportent l'effet positif du TNF sur l'expansion et la prolifération des Treg via l'activation du TNF-R2 [355–357]. Le TNF, *via* ce récepteur, favorise également la survie et l'activation d'une autre population immunosuppressive que sont les MDSCs [358,359] (Figure 16). De plus, le TNF-R2 est

également impliqué dans la polarisation des macrophages vers un phénotype immunosuppresseur [360]. Finalement, le TNF impacte aussi les populations effectrices puisqu'il a été montré que *via* l'activation du TNF-R2, le TNF induisait la mort suite à l'activation (AICD) des CTL [361] et diminuait la cytotoxicité des NK [362]. De manière intéressante, mon équipe a récemment découvert dans un modèle de mélanome murin, que la signalisation TNF-R1 pouvait être également responsable de l'AICD induite par le TNF [363].

vii. Thérapies anti-TNF dans le traitement du cancer

Au vu de l'accumulation d'évidences d'un rôle pro-tumoral du TNF, des études précliniques et cliniques ont évalué le bénéfice potentiel de l'administration d'anti-TNF dans un contexte de thérapie anti-cancéreuse. Chez la souris dans un premier temps, de multiples études décrivent l'efficacité des anti-TNF sur la croissance tumorale et la formation de métastases [328,332,364,365]. Rapidement, les anti-TNF en monothérapie furent testés chez l'Homme dans des essais cliniques de phase I et de phase II. L'utilisation d'etanercept, une protéine de fusion soluble du TNF-R2, en phase I chez 30 patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire [366], et en phase II chez 16 patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique [367], n'a pas montré de réels bénéfices cliniques avec au mieux une stabilisation de la maladie chez 7 patientes. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'utilisation de l'infliximab, un anticorps ciblant le TNF, dans une étude pan-cancers solides avancés, où 7 patients sur 41 montrent une stabilisation de la maladie [368]. Toutefois, dans le carcinome à cellules rénales, 3 patients sur 39 ont montré une réponse partielle après traitement par l'infliximab [369]. A noter cependant que malgré une réponse clinique modeste, ces études cliniques ont permis de valider les effets biologiques sur l'inflammation (diminution de TNF, IL6 et CCL2) et la tolérance des anti-TNF chez les patients atteints de cancer. Afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique des anti-TNF, la combinaison avec d'autres thérapies semble une meilleure stratégie.

Récemment, notre équipe a démontré, dans un modèle de mélanome murin B16K1, que la combinaison des anti-PD-1 (ICB) avec des anti-TNF augmente jusqu'à 75% la survie des souris, comparée aux anti-PD-1 seuls, bénéfiques seulement chez 20% des souris [370]. D'un point de vue mécanistique, l'inhibition du TNF permettrait une meilleure infiltration dans les tumeurs, associée à une diminution de l'AICD des CTL et de l'expression de Tim-3, un point de contrôle immunitaire secondaire impliqué dans la résistance acquise aux anti-PD-1. L'amélioration de l'efficacité des ICB (anti-PD-1+anti-CTLA-4) par l'inhibition du TNF a par la suite été confirmée dans deux modèles murins de cancer du côlon (MC38 et HT29) et un

autre modèle de mélanome (B16-Ova) par le travail de Perez-Ruiz et al [371]. En supplément de l'amélioration de la réponse immunitaire anti-tumorale, cette étude a aussi montré que l'inhibition du TNF permettait de diminuer les effets indésirables liés à l'utilisation des ICI. Fort de ces résultats pré-cliniques encourageants, un essai clinique à double bras de Phase I évaluant la combinaison d'ICI [anti-PD-1 (nivolumab) et anti-CTLA-4 (ipilimumab)] avec de l'infliximab (une IgG1 chimérique neutralisant le TNF) ou du certolizumab (un Fab' pégylé neutralisant le TNF) chez des patients atteints de mélanome avancé, a débuté en 2018. L'objectif principal de l'étude est d'évaluer la sécurité et la tolérance de ces deux trithérapies. Les premiers résultats de l'essai sur 14 patients enrôlés (8 dans la cohorte certolizumab ; 6 dans la cohorte infliximab) montrent que les deux trithérapies sont sécures et tolérées, malgré des effets indésirables d'auto-inflammation (hépatites, colites) qui semblent plus fréquents chez les patients de la cohorte certolizumab. 10 réponses cliniques objectives dont 5 réponses complètes (4 dans la cohorte certolizumab, 1 dans la cohorte infliximab) et 5 réponses partielles (3 dans la cohorte certolizumab, 2 dans la cohorte infliximab) ont été observées [372]. L'augmentation des lymphocytes T de type Th1 et des taux plasmatiques d'IFNγ six semaines post-traitement suggère une activation de la réponse immune anti-tumorale systémique chez les patients des deux cohortes. Cette étude suggère pour la première fois un potentiel bénéfice clinique de la combinaison ICI et anti-TNF dans le mélanome. La suite de l'essai clinique permettra d'évaluer sur un plus grand nombre de patients la sécurité, la tolérance et l'efficacité thérapeutique de ces deux trithérapies. Compte tenu des résultats de la première partie et des signes d'efficacité thérapeutique encourageants dans la cohorte certolizumab, 12 et 6 patients ont été inclus respectivement dans la cohorte certolizumab et dans la cohorte infliximab. Si et comment les réponses clinicobiologiques diffèrent de celles observées chez les patients atteints d'un mélanome avancé et traités par l'association anti-PD-1 et anti-CTLA-4 pourra être évalué dans le cadre d'un essai clinique de phase II.

3) TNF et sphingolipides dans le cancer

De par leurs implications respectives dans les phénomènes d'apoptose mais également de survie et de prolifération cellulaire, la relation très étroite entre le TNF et le métabolisme des sphingolipides n'est pas étonnante. La modulation du métabolisme du céramide par le TNF médie nombreuses de ses fonctions biologiques, y compris dans le cancer.

L'une des premières observations de l'effet du TNF sur le métabolisme des sphingolipides fût faite dans les cellules leucémiques pré-myélocytaires humaines HL-60. Le

traitement de cette lignée avec du TNF induit une hydrolyse réversible de la sphingomyéline entrainant une différenciation monocytaire de la lignée [373]. Depuis, l'activation des sphingomyélinases acide ou neutre par le TNF a été démontrée dans diverses lignées cellulaires, dont des lignées cancéreuses [374]. Cette activation semble dépendre de l'engagement du TNF-R1 par le TNF et implique le domaine de mort et le domaine NSD (neutral sphingomyelinase domain) du TNF-R1. Alors que le domaine de mort permet l'activation de la sphingomyelinase acide, le domaine NSD interagit de manière constitutive avec la protéine FAN (factor associated with neutral SMase activation) et permet l'activation des sphingomyelinases neutres en réponse au TNF. Des études ont démontré que ces enzymes sont impliquées dans les mécanismes d'apoptose. En effet, dans des fibroblastes aSMase KO [375] ou transfectés avec un mutant dominant négatif pour FAN [376], l'apoptose induite par le TNF est partiellement réduite. La production de céramide semble primordiale dans ce mécanisme puisque l'ajout de céramide exogène sensibilise les cellules à l'effet cytotoxique du TNF [377]. De plus dans une lignée de cancer du sein (MCF7) et de fibrosarcome (L929), une étude a montré que le TNF induit une accumulation de céramide suivie de la mort de ces cellules [378]. De manière intéressante, cette étude démontre qu'en supplément de l'hydrolyse de la sphingomyéline, l'accumulation de céramide en réponse au TNF provient d'une activation globale de la synthèse des sphingolipides. L'inhibition de cette biosynthèse par l'utilisation de la fumonisine B1 (FB1), un inhibiteur des céramide synthases, rend les cellules partiellement résistantes à la mort induite par le TNF [378]. L'utilisation de la myriocine, un inhibiteur de la SPT, quant à elle, n'a pas d'effet protecteur laissant suggérer un rôle prépondérant des céramide synthases et de la voie de recyclage du céramide plutôt que de la synthèse *de novo* dans ces mécanismes d'apoptose [379]. Dans ce contexte, l'ablation des différentes céramides synthases a permis d'identifier CerS6, et son produit C16:0-céramide, comme l'isoforme de la céramide synthase essentielle à la régulation de la mort cellulaire dépendante du TNF, notamment dans l'activation de la caspase 7, la diminution de l'activation de FAK et l'augmentation de la perméabilité membranaire. A noter que la CerS6 et le C16 :0-céramide modulent également la translocation nucléaire de la caspase 3 et la sensibilité à la mort induite par TRAIL dans le cancer du côlon [380]. La production de céramide semble donc contribuer à la mort programmée des cellules cancéreuses induite par le TNF. Cependant des travaux laissent suggérer qu'elle n'est pas suffisante.

Il a été observé qu'une lignée d'ostéosarcome humain déficiente pour la nSMase2 pouvait être sensibilisée à l'effet apoptotique du TNF par ajout de céramide exogène.

Cependant, l'utilisation du PDMP, un inhibiteur de la GCS et de la lactosylceramide synthase [381] altère cette sensibilisation [382]. De plus, dans la lignée humaine HT-29 du cancer du côlon, l'inhibition de la GCS, qui atténue les niveaux de glycoSL stimulés par le TNF, abolit la mort cellulaire médiée par le TNF [383]. La conversion du céramide en glycoSL semble donc critique pour l'induction de l'apoptose en réponse au TNF. A noter que la production de glycoSL induite par le TNF ne résulte pas seulement de l'augmentation du taux de céramide par l'activation de la aSMase et de la nSMase2 mais également de la capacité du TNF a augmenté l'expression des gènes codant pour la GD3 synthase et la GM3 synthase par un mécanisme qui semble dépendre de la voie NF-κB [384,385]. Un rôle du TNF dans l'augmentation de l'expression de la GM2 synthase a pu aussi être observé dans un modèle de carcinome rénal [386]. Ainsi, une accumulation de gangliosides en réponse au TNF pourrait contribuer à la mort cellulaire de cellules cancéreuses.

Toutefois, une série de travaux de Tannenbaum et Finke montre que les gangliosides ne sont pas seulement impliqués dans la mort des cellules tumorales mais peuvent également être responsables de la mort des lymphocytes T infiltrant la tumeur. En effet, des lignées de carcinome rénal pré-traitées avec du TNF ont un effet toxique sur les lymphocytes T lors d'expérience de co-culture. Le GM2 semble jouer un rôle dans ce processus puisqu'un anti-GM2 inhibe la mort des lymphocytes T [386]. Dans le même modèle, le TNF induit une accumulation puis une sécrétion de GM1, qui adhère aux lymphocytes T. Ce revêtement de GM1 sensibilise les lymphocytes à l'effet cytotoxique du TNF *via* une diminution de l'activation de la voie NF-κB. Cette observation va au-delà des expériences *in vitro*, puisque des lymphocytes T isolés du sang périphérique de patients atteints de carcinome rénal métastatique sont également fortement recouverts de GM1. De plus, cette population contrairement aux cellules T isolées de donneurs normaux, est très sensible à l'apoptose induite par le TNF ou par du sérum de patients métastatiques, qui contient des niveaux élevés de cette cytokine [386]. Ce même groupe a pu observer que les lymphocytes T activés, mais pas les lymphocytes T naïfs, sont capables d'internaliser du GD3. Cette internalisation initie une cascade d'évènements pro-apoptotiques dont l'induction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), une augmentation de l'accumulation de p53 et de Bax, une augmentation de la perméabilité mitochondriale, la libération de cytochrome c et l'activation de la caspase-9 [387]. Tout bien considéré, il semblerait que la production de gangliosides induite par le TNF participe à certains de ses effets immunosuppresseurs.

Le céramide accumulé suite à l'activation de la aSMase par le TNF peut également être phosphorylé en céramide 1-phosphate (C1P) par l'action de la céramide kinase (CERK). Or, il se trouve que dans la lignée MCF7 de cancer du sein, le TNF semble stimuler la production de C1P de manière dépendante de la aSMase et de CERK. L'activation de la voie aSMase/CERK par le TNF, entraine la production de cytokines telles que CCL5, TNF, IL6, amplifiant ainsi le microenvironnement inflammatoire et favorisant également l'invasion et la migration des cellules tumorales [388]. A noter que CERK a été identifiée comme jouant un rôle important dans la réponse inflammatoire induite par le TNF dans des monocytes humains. En effet, l'inhibition de CERK réduit l'activation induite par le TNF des voies JNK, p38 et NF-κB ainsi que la sécrétion de cytokines inflammatoires telles que IL-1β et CCL2 [389]. Que ce soit dans un contexte physiologique ou cancéreux, CERK semble donc participer à l'inflammation dépendante du TNF.

L'axe SK1/S1P n'est pas en reste dans la régulation des effets inflammatoires du TNF, puisque la S1P intracellulaire fait partie intégrante de la signalisation du TNF. En effet, la S1P intracellulaire a été identifiée comme co-facteur direct de l'E3 ubiquitine ligase TRAF2 et participe à l'activation de la voie NF-κB en réponse au TNF [390]. Cependant, une autre étude démontre que la SK1 n'est pas nécessaire à l'activation de la voie NF-κB mais participe à l'activation de la voie p38 et diminue ainsi la production de multiple chimiokines et cytokines en réponse au TNF dont la production de CCL5 [391]. Ces divergences dans le rôle de l'axe SK1/S1P dans l'activation de NF-κB peuvent peut-être s'expliquer par une compensation de TRAF2 par TRAF5 lors de l'ablation de la SK1. Que cela soit un effet pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire, cet axe n'est pas neutre dans la médiation de l'inflammation dépendante du TNF. De plus, l'axe SK1/S1P semble également participer à l'induction de COX-2 et la production de PGE2 induite par le TNF [392]. Dans ce sens, l'inhibition de la céramidase acide, diminuant le pool de sphingosine et S1P, altère la production de PGE2 induite par le TNF [393]. Ceci supporte un rôle de cet axe dans l'inflammation médiée par le TNF. Par ailleurs, dans un modèle cellulaire d'adénocarcinome pulmonaire, la S1P a été montrée comme participant à la libération de TNF suite à l'activation du TLR-9 mais cette fois *via* une action autocrine par l'engagement des récepteurs S1PR-1 et S1PR-3 [394].

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Le mélanome cutané est un cancer de la peau agressif dont l'incidence ne cesse d'augmenter chaque année. La découverte des inhibiteurs des points de contrôle immunitaire (ICI) a constitué une révolution dans la prise en charge des patients métastatiques. En effet, l'utilisation des anticorps anti-PD-1 et anti-CTLA-4, levant les freins de la réponse anti-tumorale, a permis d'augmenter jusqu'à 57% le taux de survie globale à 5 ans de ces patients [70]. Malheureusement, la moitié des patients présente des résistances initiales ou acquises à cette thérapie. Il est donc nécessaire de décrypter la mise en place de ces résistances afin d'améliorer la prise en charge des patients.

Notre équipe a récemment montré que le TNF, une cytokine pro-inflammatoire produite par les cellules immunitaires, est impliqué dans la résistance à ces immunothérapies. En effet, l'inhibition du TNF dans un modèle murin de mélanome améliore considérablement l'efficacité des anti-PD-1 [370]. La production de TNF dans le microenvironnement tumoral suite à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques induit la mort de ces CTL (AICD) mais également induit l'expression de point de contrôle immunitaire secondaire tel que Tim-3. De façon intéressante, plusieurs études associent le TNF à des effets pro-tumoraux. En effet, il a été observé que le TNF participe au recrutement et au maintien de différentes populations immunosuppressives incluant les lymphocytes T régulateurs (Treg) [357] , les lymphocytes B régulateurs (Breg) [395] et les MDSC [345]. De plus, dans un modèle murin de transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques, il a été observé que le TNF peut directement impacter les cellules tumorales et entrainer la mise en place d'un processus semblable à l'EMT, appelée dédifférenciation du mélanome [113].

La dédifférenciation du mélanome est associée à une diminution de l'expression des antigènes mélanocytaires par les cellules tumorales et donc à une réponse immunitaire anti-tumorale moins efficace. Le facteur de transcription MITF, maestro de la différenciation des mélanocytes, est un des régulateurs clé de ce processus [74]. Une diminution de l'expression de MITF et une augmentation concomitante de facteurs souches ont par ailleurs été associées à la résistance aux traitements dans le mélanome [78,103] De plus, la dédifférenciation du mélanome participe également à la propagation métastatique puisqu'elle confère des propriétés invasives aux cellules tumorales. La mise en place de ce mécanisme par le TNF pourrait contribuer à l'agressivité du mélanome.

Le TNF est également un modulateur du métabolisme des sphingolipides. En effet, le TNF active les sphingomyélinases, enzymes responsables de la production de céramide, métabolite central de ce métabolisme [376,396] Par l'action successive de céramidases et sphingosine kinases, le céramide est dégradé en S1P. La balance céramide/S1P a été montrée comme primordiale dans la progression tumorale. En effet, de par ses effets pro-apoptotiques, le céramide diminue la progression tumorale alors que la S1P favorise la survie et la prolifération des cellules tumorales [397]. Notre équipe et d'autres ont montré que des perturbations de ce métabolisme existent dans le mélanome. Les enzymes utilisant le céramide comme substrat sont généralement surexprimées alors que les enzymes produisant le céramide sont diminuées [205]. Le métabolisme est donc orienté vers la production de sphingolipide favorisant la progression tumorale. De manière intéressante, ces perturbations sont également impliquées dans la résistance aux traitements. En effet, l'inhibition de la sphingosine kinase 1, responsable de la production de S1P [209], ou encore la surexpression de la sphingomyélinase neutre 2 [200], favorisant la production de céramide, améliore l'efficacité des anti-PD-1 et anti-CTLA-4 dans des modèles murins de mélanome. De plus, des données de la littérature suggèrent une potentielle implication de ce métabolisme dans la dédifférenciation du mélanome. En effet, d'une part il a été montré que l'aSMase entraine la dégradation protéasomale de MITF *via* l'activation de la voie MAPK [201]. D'autre part, la céramidase acide a été identifiée comme cible directe de MITF et enzyme clé dans le switch phénotypique du mélanome [213].

Au vu de la relation étroite qui existe entre le TNF et le métabolisme du céramide, et leur implication respective dans la résistance aux ICI, l'objectif général de ma thèse est d'étudier le rôle du métabolisme du céramide dans la dédifférenciation du mélanome induite par le TNF. Ce travail est articulé autour de 3 axes principaux visant à évaluer :

1) l'effet du TNF sur le métabolisme des sphingolipides dans le contexte de la dédifférenciation du mélanome
2) l'impact des modulations du métabolisme du céramide sur la dédifférenciation induite par le TNF
3) la relevance de nos découvertes fondamentales dans des cohortes de patients atteints de mélanome avancé, traités par ICI

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1) Culture cellulaire

La lignée WM35 est cultivée dans du milieu MCDB153 en poudre (SIGMA) dissout dans 1L d'eau ultra pure, contenant 1,5 g/L de Bicarbonate de Sodium, 100 mL de milieu Leibovitch (GIBCO), 840 µL CaCl2 1M, 2% SVF, et 5 µg/mL d'insuline. Les lignées A375 et WM9 sont cultivées dans du DMEM 10% SVF. Des tests mycoplasme ont été réalisés régulièrement.

2) Traitements

Les cellules sont ensemencées à J0 puis traitées à J1 par selon les expériences 50ng/ml de hTNF recombinant (Peprotech), 10µM d'Eliglustat (Sanofi Genzyme), 5µM de Fumonisin B1 (), 10µM de Myriocine (Merck), 10µM de sphingosine (Sigma-Aldrich). Pour la surexpression de la céramidase acide, des A375 ont été transduites dans du milieu complet contenant 8ug/mL protamine sulphate par un lentivecteur codant pour ASAH1 (don du laboratoire de Jeffrey A. Medin) à un ratio de 10 particules virales pour une cellules (MOI 10) pendant 20H. Pour les expériences de transfection avec les siARN, une solution d'Opti-MEM contenant de la lipofectamine RNAimax (1/100) et 10nM de siARN a été préparée et laissée 20 min à température ambiante. Puis les cellules ont été ensemencées avec cette solution.

siARN	Séquences/Références	Fournisseurs
siContrôle	5'GUACCGCACGUCAUUCGUAUCdTdT3'	Eurofin
siASAH1-1	5'AAUCAACCUAUCCUCCUUCAGdTdT3'	Eurofin
siASAH1-2	5'CACGAUUAACUGUGAAAUGUAdTdT3'	Eurofin
siASAH1-3	#Cat : AM16708 ID : 14389	ThermoFisher

3) RNA-Seq

Les WM35 ont été ensemencées à J0 puis traitées en cinétique inverse au temps 6h, 24h, 48h, et 72h par du TNF à 50ng/ml. 4 expériences indépendantes ont été réalisées. Les A375 parentales ou A375 surexprimant la céramidase acide ont été ensemencées puis traitées soit 24h, 48h ou 72h par du TNF à 50ng/ml. 4 expériences indépendantes pour chaque temps ont été réalisées. Les ARN ont été extraits en utilisant un kit d'extraction d'ARN de chez Qiagen (RNeasy Plus mini kit) puis rétro-transcrit sous l'action de l'enzyme RT iScript (Biorad). Le RNA-Seq a été réalisé par le plateau technologique du Centre de Recherches en Cancérologie. Les fichiers FASTQ ont été alignés en utilisant RSEM (v1.2.25) [398] et la référence GRCh38.p13. L'analyse différentielle a été réalisée à l'aide du paquet DESeq2 de R [399]. Les gènes différentiels significatifs ont été définis comme ayant un logFC<1 ou un logFC>1 et une valeur p corrigée <0,05. Leur enrichissement dans les voies de signalisation a été calculé à

l'aide du logiciel AutoCompare ZE [400] avec les bases de données Gene Ontology C5, KEGG, Reactome et H. Le score d'enrichissement de l'échantillon (SES) a été calculé à l'aide du logiciel AutoCompare_SES [401]

4) Signatures de l'état de différenciation à partir des données RNA Seq :

Les signatures génétiques de l'état de différenciation cellulaire ont été récupérées dans la littérature : les signatures prolifératives/invasives sur 86 cultures de mélanome de Hoek et al. [74], les 4 signatures de lignées primaires de mélanome de Tsoi et al. [78], et les signatures MEL/NPLAS/MES de Andrews et al. [237]. Pour chaque signature génétique, nous avons créé un score, en calculant la moyenne géométrique de l'expression de la liste des gènes. Nous avons ensuite calculé la corrélation de Spearman [402] entre toutes les signatures en utilisant des ensembles de données publiques RNA-Seq de 173 tumeurs de mélanome humain [119,403,404]. Le nombre de gènes communs entre les signatures hautement corrélées étant très faible (diagramme de Venn), cela suggère que chaque score de signature apporte un éclairage unique sur l'état de la cellule tumorale. Compte tenu de ces informations, nous avons créé 3 nouveaux scores basés sur les 3 groupes hautement corrélés que nous avons observés à partir du regroupement hiérarchique (basé sur les distances euclidiennes entre les corrélations des scores), en faisant la moyenne des scores dans chaque groupe (Dedifferentiated, Transitory, Differentiated). Nos signatures fusionnées ont été corrélées à tous les processus biologiques des sphingolipides (Gene Ontology) avec la corrélation spearman. Les activités des voies ont été calculées à l'aide de la fonction GSVA du package gsva [405].

5) Activités des facteurs de transcription :

Pour prédire l'activité des facteurs de transcription (TF), nous avons utilisé DoRothEA [406], qui met en relation tous les régulateurs correspondant à l'expression des gènes cibles des TF. Les activités des TF ont été estimées à l'aide de l'analyse d'enrichissement basée sur les rangs (aREA) du package R Viper [407]. Dans le cadre du package R Dorothea, aREA calcule un score d'enrichissement normalisé pour chaque régulateur sur la base des rangs moyens de ses cibles. La base de données Dorothea classe les régulons avec un niveau de confiance (A à E). Nous avons exclu le niveau E afin d'obtenir un meilleur aperçu de la base de données, ce qui nous a laissé 361 régulons. Pour obtenir les activités significatives entre les conditions, nous avons utilisé la fonction msviper, qui fait partie du package VIPER.

6) RNA-Seq sur données publiques :

Nous avons travaillé sur 3 cohortes ([119,403,404] de patients atteins de mélanome avancé en utilisant seulement les échantillons pré-traitement de patients traités par anti-PD-1. Les patients présentant une maladie stable selon les critères RECIST et une bithérapie (anti-PD1+anti-CTLA4) ont été exclu. Gide et al. [403] ont décrit dans leur cohorte 19 répondeurs et 16 progresseurs, Riaz et al. [119] ont décrit 10 répondeurs et 23 progressifs et Liu et al. [404] ont décrit 47 répondeurs et 58 progressifs. La correction de batch a été effectuée à l'aide de la fonction Combat-Seq, qui fait partie du package sva [408], et la normalisation a été effectuée avec le pipeline DESEQ2.

7) Visualisation des données

Plusieurs packages ont été utilisés pour la visualisation des données : FactoMineR [409] et factoextra [410] pour tous les graphes d'ACP; Corrplot [[411]] pour le graphe de corrélation des signatures de dédifférenciation ; ggplot2 [412] pour les diagrammes de Venn avec ggvenn, et tous les boxplots ; le paquet ComplexHeatmap [413] pour les Heatmaps.

8) qPCR

Après traitement, les cellules ont été lavées au PBS, décollées par la trypsine puis centrifugées (1500 rpm, 3 min.). L'ARN a été ensuite extrait selon le protocole du fournisseur (kit RNeasy, Qiagen). La concentration d'ARN a été déterminée en utilisant un Clariostar. Un µg d'ARN a été rétro-transcrit sous l'action de l'enzyme RT iScript (Biorad). 25 ng d'ADNc ont été utilisés comme matrice pour la PCR quantitative. Les réactions ont été réalisées dans le thermocycleur StepOne (Applied Biosystems) en utilisant le QuantiFast SYBR Green Master Mix et les sondes d'intérêts. Les résultats ont été quantifiés en utilisant le logiciel du système StepOne. Les ADNc des ARNm codant pour GAPDH et HPRT pour la normalisation de l'expression des gènes humains. Le taux de variation de l'expression du gène cible stimulé par rapport au témoin non stimulé a été déterminé selon la formule suivante : taux de variation = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, où $\Delta\Delta Ct$ = (Ct_{Cible} - $Ct_{Contrôle}$) stimulé - (Ct_{Cible} - $Ct_{Contrôle}$) non stimulé. Les valeurs de Ct ont été définies comme le numéro de cycle au cours duquel les signaux de fluorescence sont détectés.

9) Cytométrie en flux

Après traitement, les cellules ont été décollées par la trypsine, lavées au PBS, puis centrifugées (1500 rpm, 3 min.). Les culots cellulaires ont été ensuite repris dans 100 µL de tampon FACS (PBS 0.5% BSA, 2 mM EDTA) puis mis en plaque 96 puits à fond conique. Les cellules ont été ensuite incubées 30 min dans le noir dans le tampon FACS contenant un anticorps ciblant

les marqueurs membranaires et un marqueur de viabilité (Live/Dead, Thermofisher #L3224). À la fin de l'incubation, les cellules ont été centrifugées et lavées deux fois avec du tampon FACS, puis incubées pendant 30 min dans un tampon de fixation/perméabilisation (eBioscience, #00-5223-56, #00-5123-43). Après un lavage au tampon de perméabilisation (eBioscience, #00-8333-56), les cellules ont été incubées avec les anticorps ciblant les marqueurs membranaires. Après 2 lavages, les cellules ont été analysées par cytomètrie en flux (LSRII BD).

Cibles	Fluorochrome	Dilution	Référence	Fournisseurs
NGFR	AF647	1/200	C40-1457	BD Pharmingen
AXL	PE-Cy7	1/200	25-1087-42	eBioscience
Melan-a	PE	1/200	sc-20032	Santa Cruz Biotechnology

10) Simple western

Après traitement, les cellules ont été décollées par la trypsine, lavées au PBS, puis centrifugées (1500 rpm, 3 min.). Les culots cellulaires ont été ensuite repris dans 100 µL de tampon RIPA (tampon RIPA ; Sigma #R0278) et soniqués 20 secondes, amplitude 40% puis centrifugés 10 minutes à 14 000 g à 4°C. Les surnageants ont été recueillis et utilisés pour la quantification des protéines par un dosage BCA puis dilués dans le mastermix fluorescent et distribués dans la plaque avec tous les réactifs du kit Simple Western (Separation module 12-230 kDa ; Protein Simple #SM W004) Le résultats sont analysés à l'aide du logiciel Compass for Simple Western.

Anticorps primaire	Anticorps secondaire	Dilution anticorps	Concentration protéines	Référence	Fournisseurs
Erk	Rabbit	1/100	0.1 mg/ml	4695	CellSignaling
Phospho Erk	Rabbit	1/25	0.5 mg/ml	AF1018-SP	R and D Systems
MITF	Rabbit	1/50	0.5 mg/ml	13092-1-AP	Proteintech

11) Western Blot

Après traitement, les protéines ont été extraites (tampon de lyse cellulaire ; Cell Signaling Technology) et 30 µg de protéines ont été électrophorisés sur une PAGE-SDS de 7,5 % à 12,5%, transférées sur une membrane de nitrocellulose (Perkin-Elmer) et marquées par un anticorps monoclonal ciblant la céramidase acide. Les protéines ont été détectées au chemidoc à l'aide d'un système de détection ECL (Bio-Rad) et quantifiées à l'aide d'ImageJ.

12) Dosage de la céramidase acide

Les cellules cultivées ont été recueillies et lavées deux fois avec du PBS. Les culots cellulaires ont été remis en suspension dans 100 µl d'une solution de saccharose 0,2 M, puis ils ont été soniqués. Les homogénats cellulaires ont été centrifugés à 15 000 g pendant 3 minutes. Le surnageant a été recueilli et utilisé pour la quantification des protéines par un dosage BCA. L'essai enzymatique a été réalisé dans des plaques à 96 puits. En bref, chaque puits contenait un mélange de 74,5 µl de tampon acétate de sodium 25 mM pH 4,5, 0,5 µl d'une solution de substrat Rbm14-12 4 mM dans l'éthanol (concentration finale du substrat 20 µM ; concentration finale de l'éthanol 0,5%), et une quantité fixe de protéine (de 10 à 25 µg) dans un volume de 25 µl d'une solution de sucrose 0,2 M. Les échantillons de contrôle négatif étaient constitués du même mélange d'incubation en l'absence d'extraits de protéines. La plaque a été incubée à 37°C pendant 3 h sans agitation. Ensuite, la réaction enzymatique a été arrêtée en ajoutant 50 µl de méthanol et 100 µl d'une solution fraîche de 2,5 mg/ml de $NaIO_4$ dans un tampon glycine/NaOH 100 mM pH 10,6 dans chaque puits. La plaque a été protégée de la lumière pendant 2 h, puis la fluorescence libérée a été quantifiée à l'aide d'un lecteur de fluorescence pour microplaques (λex 360 nm, λem 446 nm).

13) Dosage des sphingolipides dans les cellules :

Les sphingolipides ont été extraits et préparés comme précédemment documenté [414] puis analyses par LC/MS comme précédemment décrit [202].

14) Dosage des sphingolipides dans le plasma des patients :

Les sphingolipides du plasma de patients atteints de mélanome avancé traités par ipilimumab et nivolumab et participant à l'essai clinique MELANFα (NCT03348891) ont été mesurés par LC/MS. Les réponses cliniques ont été évaluées selon les critères RECIST V1.1 à la semaine 12 après l'induction du traitement. Les patients participant à cet essai ont donné leur consentement éclairé.

15) Analyses Statistiques :

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Un T test apparié pour la comparaison de 2 groupes a été effectué, ou un test ANOVA pour la comparaison d'expériences comprenant ≥ 3 groupes. Une valeur p inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$).

RÉSULTATS

Ceramide metabolism alterations contribute to TNF-induced melanoma dedifferentiation

Carine Dufau[1,2,3], Matthieu Genais[1,2,3], Elodie Mucher[1,2,3], Benjamin Jung[1,2,3], Virginie Garcia[1,2], Anne Montfort[1,2], Marie Tosolini[1,2], Christopher J. Clarke[4], Jeffrey A. Medin[5], Yusuf A Hannun[4], Thierry Levade[1,2,3,6], Nicolas Meyer[1,2,3,7], Vera Pancaldi[1], Nathalie Andrieu-Abadie[1,2,3, #] and Bruno Ségui[1,2,3, #, *]

[1] INSERM UMR 1037, Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Toulouse, France.
[2] Equipe Labellisée Fondation ARC pour la recherche sur le cancer, Toulouse, France.
[3] Université Toulouse III - Paul Sabatier, Toulouse, France.
[4] Stony Brook Cancer Center, and Department of Medicine, Stony Brook University, New York, New York.
[5] Department of Biochemistry, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin, USA.
[6] Laboratoire de Biochimie, Institut Fédératif de Biologie, CHU Purpan, Toulouse, France.
[7] Service d'Oncodermatologie, Institut Universitaire du Cancer (IUCT-O), CHU de Toulouse, Toulouse, France.

[#] These authors contributed equally: Nathalie Andrieu-Abadie and Bruno Ségui.

* Corresponding author: bruno.segui@inserm.fr

En prévision de soumission

Abstract

Advanced cutaneous melanoma is a poor-prognosis skin cancer with high metastatic potential. During metastatic spreading, melanoma cells can dedifferentiate towards an invasive phenotype, leading to a decreased expression of MITF-dependent melanoma antigens, and immune escape. Accumulating evidence indicates that Tumor Necrosis Factor (TNF) may participate in melanoma progression and resistance to immunotherapies. Herein, we demonstrate that TNF-induced melanoma cell dedifferentiation was associated with a global modulation of sphingolipid metabolism as evaluated by RNA sequencing and mass spectrometry. TNF decreased the expression and activity of acid ceramidase (AC), encoded by the ASAH1 gene. RNAi-directed knockdown of AC was sufficient to trigger melanoma cell dedifferentiation whereas AC overexpression attenuated this process upon TNF treatment. Moreover, TNF increased the expression of glucosylceramide synthase (GCS), encoded by the UGCG gene, as well as the accumulation of glycosphingolipids. Eliglustat, an inhibitor of GCS, significantly attenuated the TNF-induced melanoma cell dedifferentiation process. To assess the clinical relevance of our findings, we performed unsupervised analysis of plasma sphingolipid content evolution along therapy in 52 patients treated with immune checkpoint inhibitors in combination, or not, with anti-TNF. This led us to identify major sphingolipids to predict the clinical outcome, the top 2 being C24:0 dihexosylceramides and total trihexosylceramides, which were significantly increased in non-responders. Collectively, our study highlights that ceramide metabolism alterations are causally involved in TNF-induced melanoma cell dedifferentiation and suggests that the evolution of specific ceramide metabolites in plasma may be considered as predictive biomarkers of resistance to immunotherapy.

Introduction

The care for patients with metastatic melanoma has recently been revolutionized by the development of immunotherapies targeting immune checkpoints such as CTLA-4 and PD-1 with specific inhibitors (ICI). However, many patients do not benefit from these treatments and a significant proportion of responders experience tumour relapse within two years after treatment induction [1]. Moreover, most patients develop major immune-related adverse events (irAEs). Some of them, such as colitis, can be treated with a bolus of infliximab, an anti-Tumour Necrosis Factor α (TNF) in patients who are refractory to corticotherapy [2]. Whether TNF blockade affects the anti-melanoma immune response triggered by immunotherapies in patients remains to be determined.

We discovered that TNF impairs anti-melanoma immune responses by inducing cell death of activated CD8+ T lymphocytes in a TNFR1-dependent manner [3]. TNF, which is produced in melanoma tumours following ICI, is involved in the resistance to anti-PD-1 in mice [4]. Mechanistically, TNF not only induces the activation-induced cell death (AICD) of CD8+ TILs but also triggers the overexpression of PD-L1 and TIM-3, both involved in anti-PD-1 resistance. Anti-TNF treatment significantly increases the anti-tumour effect triggered by anti-PD-1 [4]. Melero and co-workers showed that anti-TNF uncouple efficacy and tolerability in preclinical cancer models, including the B16F10-Ova model [5]. We evaluated in advanced melanoma patients the safety and tolerability of combining anti-TNF, either infliximab or certolizumab, anti-CTLA-4 (ipilimumab) and anti-PD-1 (nivolumab) in advanced melanoma patients. These first results indicate that both tritherapies are safe, with promising signs of efficacy, especially in the certolizumab cohort [6].

TNF plays a dual role in oncoimmunology, either acting as an anti-cancer factor, or behaving as an immunosuppressive cytokine [7, 8]. Whereas TNF was first identified as a cytotoxic soluble factor, mounting evidence indicates that TNF facilitates the accumulation and/or biological activity of immunosuppressive cells such as regulatory T lymphocytes (Tregs) [9], regulatory B lymphocytes (Bregs) [10] as well as myeloid-derived suppressor cells (MDSC) [11], which are key negative modulators of the immune response. Furthermore, in a mouse model of adoptive transfer of specific T cells, it has been observed that TNF can directly impact tumour cells and lead to the establishment of an an epithelial-to-mesenchymal transition EMT-like process called melanoma dedifferentiation [12].

Melanoma dedifferentiation is associated with a decrease in the expression of melanocyte antigens by tumour cells and thus a less effective anti-tumour immune response. The transcription factor MITF, the key regulator of melanocyte differentiation, is central in this process [13]. Indeed, decreased expression of MITF and a concomitant increase in stem factors have been associated with treatment resistance in melanoma [14, 15]. Moreover, melanoma dedifferentiation is also involved in metastatic spread as it confers invasive properties to tumour cells. The establishment of this mechanism by TNF could contribute to the aggressiveness of melanoma.

TNF is a potent modulator of the sphingolipid (SL) metabolism. It activates the so-called sphingomyelin-ceramide pathways as a consequence of sphingomyelinase (SMase) activation [16, 17]. Ceramide can be further metabolized to sphingosine 1-phosphate (S1P), *via* the sequential activation of ceramidases and sphingosine kinases (SK) [18, 19]. S1P is a critical modulator of lymphocyte trafficking [20] and is required for optimal activity of Tregs [21].

Interestingly, sphingosine kinase 1 (SK1) and S1P are key players of TNF signalling in melanoma cells [18]. In this context, S1P, which is produced in response to TNFR1 activation, binds to and activates the E3-ubiquitin ligase activity of TRAF2, facilitating the RIP-dependent activation of NF-κB [18], and NF-κB-dependent gene expression likely contributes to the ICI resistance [22]. Our recent observations show that human melanomas express high levels of SK1 [23]. Moreover, high levels of SK1 expression in melanoma cells participate to ICI resistance (anti-PD-1 or anti-CTLA-4) in preclinical melanoma models. Thus, SK1 inhibition potentiates the regression of melanoma upon ICI therapy in mice [24], most likely by decreasing the expression of key immunosuppressive molecules and promoting the accumulation of Tregs in the tumour bed [24]. In humans, high levels of SK1 expression in melanoma biopsies, as evaluated by *in situ* hybridization, is associated with resistance to anti-PD-1 treatment (nivolumab or pembrolizumab) [24]. Conversely, we showed that neutral SMase 2 is frequently downregulated in human melanoma samples and mouse melanoma cell lines. Re-expressing this enzyme in mouse melanoma cells enhances ceramide production and response to ICI [25]. A growing body of evidence indicates that SLs might contribute to melanoma dedifferentiation. Indeed, the acid SMase elicits MAPK activation and proteasomal degradation of MITF in melanoma [26]. In addition, the acid ceramidase (AC) has been identified as a direct transcriptional target of MITF and a key enzyme in the phenotypic switch of melanoma cells [27].

Herein, we have evaluated the impact of ceramide metabolism changes triggered by TNF in melanoma cell dedifferentiation process. We showed that TNF-induced AC inhibition likely contributes to ceramide metabolite accumulation and melanoma cell dedifferentiation. Moreover, we identified dihexosylceramides (likely lactosylceramide) as being increased in melanoma cells upon TNF treatment and plasmas from non-responder melanoma patients to immune checkpoint inhibitors.

Materials and Methods

Cell Culture: The WM35 primary human primary melanoma cell line was grown in medium containing 80% (v/v) filtered MCDB153 medium (Sigma-Aldrich) complemented with 17.86 mM NaHCO3 and adjusted to pH 7.4, 20% (v/v) Leibovitz's L-15 medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 1.68 mM CaCl2, 5 µg/mL human insulin solution (Sigma-Aldrich) and 2% Fetal Bovine Serum (FBS). The human metastatic cell lines A375 and WM9 were grown in DMEM medium supplemented with 10% FBS. A375 overexpressing AC were generated by transduction using an optimized lentiviral vector coding for AC. Cells were seeded in 6-well plates until a confluency of 75-85% was obtained. Then, cells were transduced in 1 mL of media with 8 µg/mL protamine sulphate and virus at a multiplicity of infection of 10.
All cell lines were regularly tested for mycoplasma contamination.

Cell treatment: Cells were seeded at Day 0, and then treated at Day 1 with or without 50 ng/mL human recombinant TNF (Peprotech). When indicated, cells were treated at Day 1 with 10 µM of Eliglustat (Sanofi Genzyme), 5 µM of Fumonisin B1 (Sigma-Aldrich), 10 µM of Myriocin (Merck), 10µM of C2-ceramide and 10µM of sphingosine (Sigma-Aldrich). For transfection experiments with siRNAs, a solution of Opti-MEM containing RNAimax lipofectamine (1/100) and 10 nM of siRNA was prepared and left for 20 min at room temperature. The cells were then seeded with this solution. siCTRL, siASAH1-1, siASAH1-2 were from Eurofin (sequences below). siASAH1-3 was from ThermoFisher (Catalog number: AM16708 ID:14389).
siCTRL: 5'GUACCGCACGUCAUUCGUAUCdTdT3'
siASAH1-1: 5'AAUCAACCUAUCCUCCUUCAGdTdT3'

siASAH1-2: 5'CACGAUUAACUGUGAAAUGUAdTdT3'

RNAseq analyses: WM35 were seeded at Day 0 and then treated in reverse kinetics at 6h, 24h, 48h and 72h with 50 ng/mL TNF. Four independent experiments were performed. Parental A375 or A375 overexpressing acid ceramidase were seeded and then treated with or without 50 ng/mL TNF for 24, 48 or 72h. Four independent experiments were performed at each time point. Alternatively, WM35 were transfected with siCTRL or siASAH1-1 72h before RNA extraction. Two independent experiments were performed with siASAH1-1 carried out in duplicate. RNAs were extracted using a Qiagen RNA extraction kit (RNeasy Plus mini kit) and then reverse transcribed using the RT iScript enzyme (Biorad). The RNA sequence was performed by the technology cluster of the Cancer Research Center of Toulouse. FASTQ files were aligned using RSEM (v1.2.25) [28] and reference GRCh38.p13. Differential analysis was performed using the DESeq2 package of R [29]. Significantly differential genes were defined as having logFC<1 or logFC>1 and corrected p value <0.05. Their enrichments in signaling pathways were calculated using AutoCompare ZE software [30] with the Gene Ontology C5 databases, KEGG, Reactome and H. The Sample Enrichment Score (SES) was calculated using AutoCompare_SES software [31].

Differentiation state signatures from RNA Seq data: Cell differentiation state gene signatures were recovered from literature, including proliferative/invasive signatures using microarray on 86 melanoma cultures [13], signatures from human melanoma cell lines and patient tumours [32], and MEL/NPLAS/MES signatures [33]. For each gene signature, we created a score, computing the geometric mean expression of the list of genes. We then computed the spearman correlation [34] across all signatures using public RNA-seq datasets of 173 human melanoma tumours [35-37]. Common gene number across highly correlated signatures being really low (Venn Diagram), suggesting that each signature score carried unique insight on the tumour cell state. Given that information, we created 3 new scores based on the 3 highly correlated clusters we observed from hierarchical clustering (based on the euclidean distances between scores correlations), averaging the scores in each cluster (Dedifferentiated, Transitory, Differentiated). Our merged signatures were correlated to all sphingolipid biological processes (Gene Ontology) with spearman correlation. Pathway activities were computed using the GSVA function from the gsva package [38].

Transcription factor activities: To predict transcription factor (TF) activity, we used DoRothEA [39], which relates all regulons corresponding to TF-target gene expression. TF activities were estimated using analytic Rank-based Enrichment Analysis (aREA) from the Viper R package [40], as part of the dorothea R package. aREA computes a normalized enrichment score for each regulon based on the average ranks of its targets. Dorothea database ranks regulons with a confidence level (from A to E). We filtered out only the E level to get more insight from the database, leaving us with 361 regulons. To obtain significant activities across conditions, we used msviper function, part of the VIPER package, which computes MAster Regulator INference Analysis.

RNA-Seq on public data: three cohorts were recovered for this paper; pre-treatment samples from anti-PD-1-treated patients were used. Stable disease patients with RECIST criteria and bitherapy (anti-PD1+anti-CTLA4) were filtered out. Gide *et al.* [35] composed of 19 responders and 16 progressors, Riaz *et al.* [36] composed of 10 responders and 23 progressors and Liu *et al.* [37] composed of 47 responders and 58 progressors. Batch correction was done using Combat-Seq function, part of the sva package [41], and normalization was done with the DESEQ2 pipeline.

Data visualisation: Several packages were used for data visualization: FactoMineR [42] and factoextra [43] for all PCA/PCA plots; Corrplot package [44] for the correlation plot of dedifferentiation signatures; ggplot2 [45] for Venn diagrams with ggvenn, and all boxplots; ComplexHeatmap package [46] for heatmaps.

RTqPCR analyses: After treatment, the cells were washed with PBS, detached by trypsin and centrifuged (1,500 rpm, 3 min.). RNA was then extracted according to the supplier's protocol (RNeasy kit, Qiagen). RNA concentration was determined using a Clariostar. One µg of RNA was reverse transcribed using the RT iScript enzyme (Biorad). 25 ng of cDNA was used as template for quantitative PCR. Reactions were performed in the StepOne thermal cycler (Applied Biosystems) using the QuantiFast SYBR Green Master Mix and the probes of interest. Results were quantified using the StepOne system software. The cDNAs of mRNAs encoding GAPDH and HPRT were used to normalize human gene expression. The rate of change of stimulated target gene expression compared to the unstimulated control was determined according to the following formula: rate of change = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, where $\Delta\Delta Ct$ = (Target Ct - Control Ct) stimulated - (Target Ct - Control Ct) unstimulated. The Ct values were defined as the cycle number in which the fluorescence signals are detected.

Flow cytometry analyses: After treatment, the cells were detached by trypsin, washed with PBS, then centrifuged (1,500 rpm, 3 min.). The cell pellets were then suspended in 100 µL of FACS buffer (PBS 0.5% BSA, 2 mM EDTA) and placed in 96-well V bottom plates. The cells were then incubated for 30 min in the dark in FACS buffer containing a mix of antibodies targeting membrane markers and a viability marker (Live/Dead, Thermofisher #L3224). At the end of the incubation, cells were centrifuged and washed twice with FACS buffer, then incubated for 30 min in fixation/permeabilization buffer (eBioscience, #00-5223-56, #00-5123-43). After washing with permeabilization buffer (eBioscience, #00-8333-56), cells were incubated with antibodies targeting intracellular markers. After 2 washes, the cells were analyzed by flow cytometry (LSRII BD). The following antibodies were used at the indicated dilutions: AF647-coupled anti-NGFR (1/200; BD Pharmingen, C40-1457); PE-Cy7-coupled anti-AXL (1/200; eBiosience, 25-1087-42); PE-coupled anti-Melan-a (1/200; Santa Cruz Biotechnology, sc-20032-PE).

Simple Western analyses: After treatment, the cells were detached by trypsin, washed with PBS, then centrifuged (1500 rpm, 3 min.). The cell pellets were suspended in 100 µL of RIPA buffer (RIPA buffer; Sigma #R0278) and sonicated for 20 seconds, 40% amplitude and then centrifuged for 10 minutes at 14,000 g at 4°C. The supernatants were collected and used for protein quantification by BCA assay and then diluted in the fluorescent mastermix and dispensed into the plate with all the reagents of the Simple Western kit (Separation module 12-230 kDa; Protein Simple #SM W004). The results were analyzed using the Compass for Simple Western software.

Western blot analyses: After treatment, proteins were extracted in cell lysis buffer (Cell Signaling Technology) and 30 µg of proteins were electrophoresed on 7.5% to 12.5% SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane (Perkin-Elmer) and labelled with a rabbit polyclonal anti-acid ceramidase antibody (a kind gift from Dr. K. Sandhoff, Bonn, Germany) acid ceramidase or monoclonal anti-β-Actin (Clone 13E5) (Cell Signaling Technology). Proteins were detected with chemidoc using an ECL detection system (Bio-Rad) and quantified using ImageJ.

Acid ceramidase activity: Acid ceramidase activity was measured as previously reported [47]. Briefly, cells were collected and washed twice with PBS. The cell pellets were suspended in 100 µL of 0.2 M sucrose solution and sonicated. The cell homogenates were centrifuged at 15,000 *g* for 3 minutes. The supernatant was collected and used for protein quantification by BCA assay. The enzyme assay was performed in 96-well plates. Briefly, each well contained a mixture of 74.5 µL of 25 mM sodium acetate buffer pH 4.5, 0.5 µL of a 4 mM Rbm14-12 substrate solution in ethanol (final substrate concentration 20 µM; final ethanol concentration 0.5%), and a fixed amount of protein (10-25 µg) in a 25 µL volume of 0.2 M sucrose solution. The negative control samples were made up of the same incubation mixture in the absence of protein extracts. The plate was incubated at 37°C for 3 h without shaking. Then, the enzyme reaction was stopped by adding 50 µL of methanol and 100 µL of a fresh solution of 2.5 mg/mL NaIO4 in 100 mM glycine/NaOH buffer pH 10.6 to each well. The plate was protected from light for 2 h and then the released fluorescence was quantified using a microplate fluorescence reader (λex 360 nm, λem 446 nm). The amount of umbelliferone released was calculated from the fluorescence intensity using calibration curves with umbelliferone in the range of 0-3,000 pmol.

Determination of sphingolipid content: Sphingolipids were extracted and prepared as previously published [48] and analyzed by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) as previously described [49].

Plasma shingolipid content in advanced melanoma patients treated with ipilimumab and nivolumab: Ceramide metabolites in the plasma of advanced melanoma patients treated with ipilimumab and nivolumab enrolled in the clinical trial MELANFα (NCT03348891) were measured by LC/MS. Clinical responses were evaluated using RECIST V1.1 criteria at week 12 post-treatment induction. Patients enrolled in this trial gave informed consents.

Statistical analysis: All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9 software. Results are expressed as mean ± SEM, and group comparisons were performed with a Paired T Test for comparison of 2 groups, or a One-way ANOVA test for comparison of experiments that consisted of ≥ 3 groups. A p value inferior to 0.05 was considered statistically significant (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0,0001$).

Results

TNF-induced melanoma cell dedifferentiation is associated with sphingolipid metabolism changes.

To evaluate the impact of ceramide metabolism changes in TNF-induced melanoma cell dedifferentiation, we initially incubated WM35 human primary melanoma cell line in the presence or absence of 50 ng/mL TNF for 6h, 24h, 48h and 72h. Global transcriptomic analysis by RNA sequencing (RNA-Seq) shows that TNF triggered WM35 cell dedifferentiation, from melanocytic and transitory to neural-crest and undifferentiated gene signatures as defined by Tsoi and coworkers [32] (Figure 1A). To further evaluate the impact of TNF on the dedifferentiation process, we compared different gene signatures from the literature. Correlation analyses on 3 publicly available datasets (see methods) of tumor biopsies from melanoma patients showed 3 main blocks of highly positively correlated gene signatures, indicating three main states of melanoma differentiation: differentiated, transitory and dedifferentiated (Supplementary Figure 1A). However, we found those signatures exhibited very low number of common genes (Supplementary Figure 1B). Thus, to better cover TNF-induced dedifferentiation, we merged the different gene signatures being positively correlated and generated a score for evaluating the differentiated, transitory and dedifferentiated melanoma states. As evaluated by PCA projection of the RNAseq data, TNF treatment was associated with a dedifferentiation process already at 6h, with the maximum effect at 24h and then a progressive decline at 48h and 72h (Figure 1B). Accordingly, the differentiated score decreased significantly with a maximum at 24h while the dedifferentiated score increased concomitantly (Figure 1C). TNF-induced dedifferentiation was confirmed at the protein level by flow cytometry analyses. Whereas TNF promoted the upregulation of the stemness factor NGFR at the cell surface of WM35, it decreased the expression of the melanocytic marker MELAN-A (Supplementary Figure 2A).

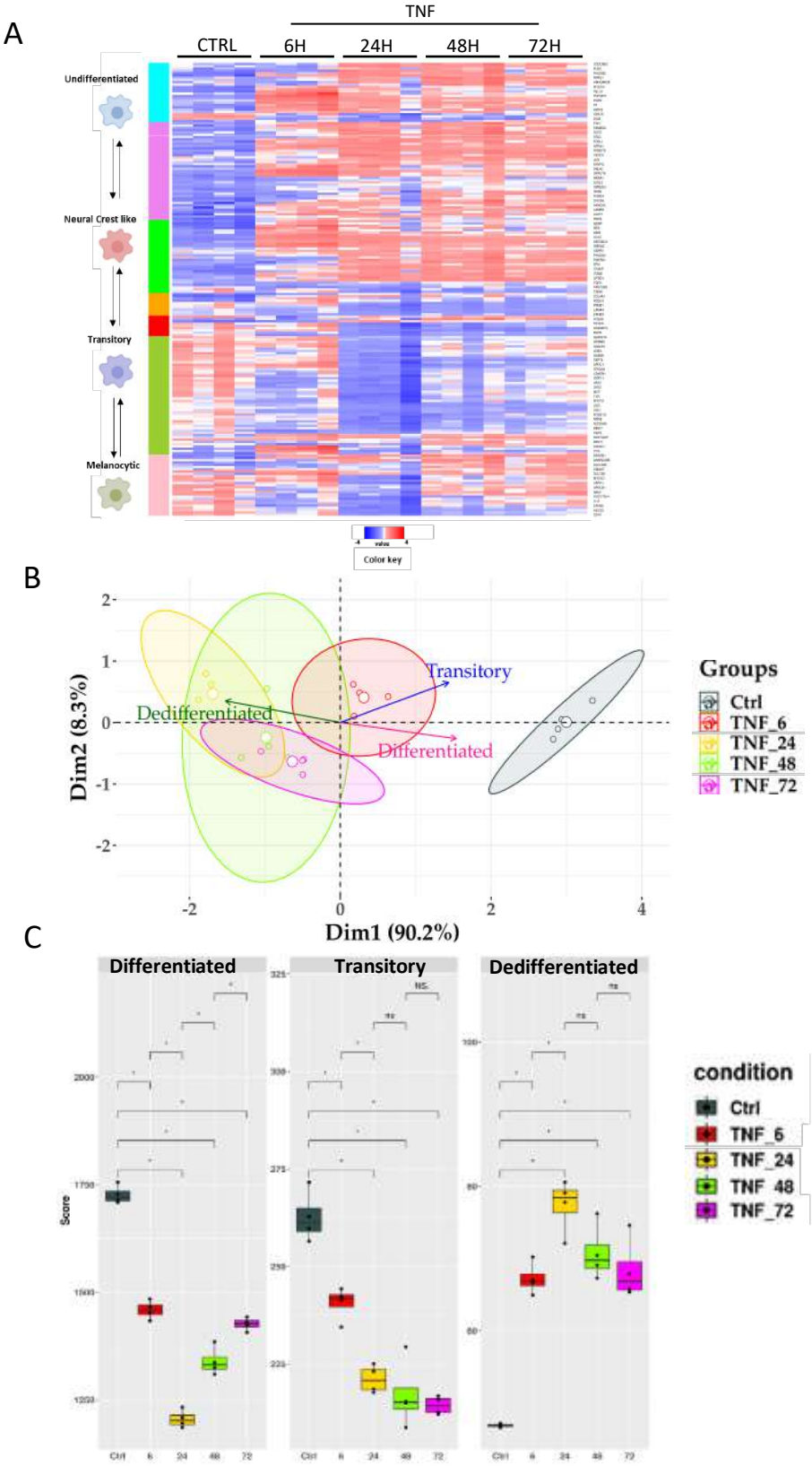


Figure 1: TNF induces melanoma cell dedifferentiation. WM35 melanoma cells were treated with 50 ng/mL TNF for 6, 24, 48, 72h and then analyzed by RNAseq (n=4). **A,** Heatmap representing the gene expression of melanoma cells upon TNF treatment clustered based on the dedifferentiation signatures published by Tsoi et al. (CTRL: control). **B,** PCA projection on control (Ctrl) and TNF-treated samples using our merged dedifferentiation scores. **C,** Score evolution across TNF treatment (Wilcoxon, *p<0,05; ns: not significant).

We next analyzed the expression of genes related to the ceramide metabolism as referred by gene ontology (GO). The greater changes in the expression of genes related to the ceramide metabolism were observed at 24h post-TNF treatment (Figure 2A). On the one hand, the expression of 24 genes such as *UGCG* and *SGMS2*, which encode the glucosylceramide synthase and sphingomyelin synthase 2, respectively, were increased at the different time points. On the other hands, the expression of 6 genes such as *ASAH1*, which encodes the acid ceramidase, were decreased (Figure 2A). Extending our analysis to the GO pathways, we found various sphingolipid biosynthetic pathways being increased upon TNF treatment, whereas sphingolipid catabolic pathways were decreased (Figure 2B). The connections between ceramide metabolism and melanoma differentiation states were also evidenced by correlation analyses on our data set. As a matter of fact, whereas the dedifferentiation state was negatively correlated with the catabolic processes for ganglioside, glycosylceramide and ceramide, it was positively correlated with the regulation of sphingolipid biosynthetic process (Figure 2C). To further evaluate the impact of TNF signalling on ceramide metabolism, we performed mass spectrometry analyses on cell lipid extracts from WM35 incubated with or without 50 ng/mL TNF for 24, 48 and 72h. The major changes were observed at 48h post-TNF treatment, with an increase of various ceramide metabolites, including some (dihydro)sphingomyelins, (dihydro)ceramides, monohexosylceramides and dihexosylceramides (Figure 2D). The impact of TNF on ceramide metabolism was unlikely restricted to the primary melanoma cell line WM35. Indeed, when the metastatic melanoma cell line WM9 was incubated with TNF, we observed a dedifferentiation process as evaluated by RT-qPCR on a set of transcripts, representative of the differentiation status (supplementary Figure 2B). The dedifferentiation process was also observed at the protein level, with a significant decrease of Melan-a expression at 48 and 72h, and a trend to NGFR upregulation at all times, as evaluated by flow cytometry (supplementary Figure 2C). As for WM35, this dedifferentiation process was also accompanied by the alteration of the expression of genes related to the ceramide metabolism. Similar to what we noticed in WM35 cells, TNF triggered the decrease of *ASAH1* expression in WM9 cells, while increasing *UGCG* expression (supplementary Figure 2D).

Collectively, our data indicate that TNF-induced melanoma cell dedifferentiation is associated with the accumulation of sphingolipid metabolites, due to an increase and a decrease in sphingolipid biosynthetic and catabolic pathways, respectively.

TNF-induced acid ceramidase inhibition likely contributes to melanoma cell dedifferentiation.

Among the ceramide metabolism gene being significantly downregulated in melanoma cell lines upon TNF treatment we identified *ASAH1*, which encodes AC (Figure 2A and supplementary Figure 2D). Interestingly, AC has been shown to be driven by MITF and downregulated in invasive melanoma cells [27, 50]. Accordingly, the expression level of *ASAH1* was downregulated following the same kinetic as melanocytic markers, with a maximum inhibition at 24h post TNF treatment (supplementary Figure 3A). At the opposite, mesenchymal markers were increased upon TNF, being already significant at 6h (supplementary Figure 3A). We next monitored the impact of TNF on AC specific enzyme activity. Incubating WM35 melanoma cells with TNF significantly inhibited AC enzyme activity under our experimental conditions (supplementary Figure 3B). In line with the latter observation, we found that TNF triggered the downregulation of AC protein expression as evaluated by Western blot. This concerned the precursor protein as well as the two AC subunits alpha and beta (supplementary Figure 4C).

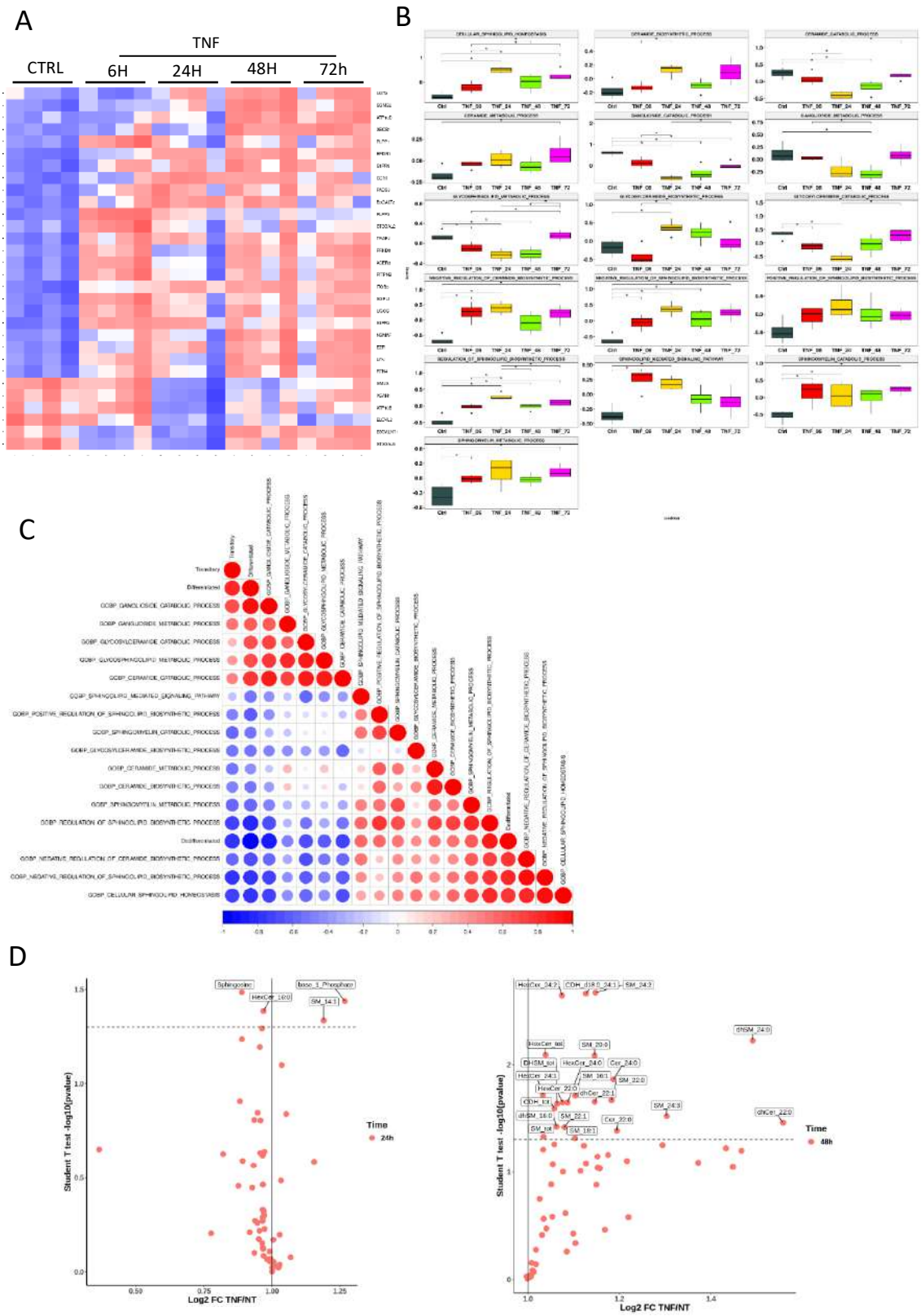


Figure 2: TNF-induced melanoma dedifferentiation is associated with a global production of SL. WM35 melanoma cells were treated with 50 ng/mL TNF for 6, 24, 48, 72h and then analyzed by RNAseq (n=4). **A,** Heatmap showing the expression of ceramide metabolism genes significantly modulated by TNF in WM35 melanoma cells. **B,** Pathway activities inferred by GSVA (see Methods) of the sphingolipid related biological processes (GO) along TNF treatment (Wilcoxon, *p<0,05). **C,** Significant correlation (Spearman) between our scores and sphingolipid-related biological processes (GO) identified in (B). **D,** Sphingolipid content, as analyzed by Mass Spectrometry, of WM35 untreated (NT) or treated with 50 ng/mL TNF for 24h (left panel) and 48h (right panel). Data are represented by Log2(Fold Change) as compared to untreated cells

To evaluate whether AC inhibition upon TNF contributed to melanoma cell dedifferentiation, WM35 cells were transfected with siRNA targeting AC transcript. AC knockdown triggered melanoma cell dedifferentiation process as evaluated by RNA-Seq analysis (Figure 3A). Indeed, the AC knockdown cells exhibited transitory and dedifferentiated phenotypes (Figures 3A and B), indicating that knocking down AC was sufficient to stimulate the dedifferentiation process of melanoma cells. This tenet was further documented by transfecting the WM35 cells with another siRNA sequence, which promoted the dedifferentiation process as evaluated by RT-qPCR (Supplementary Figure 3D). Accordingly, our analysis of melanoma samples from retrospective cohorts further illustrates that AC was downregulated in melanoma samples from transitory and dedifferentiated melanomas (Figure 3C).

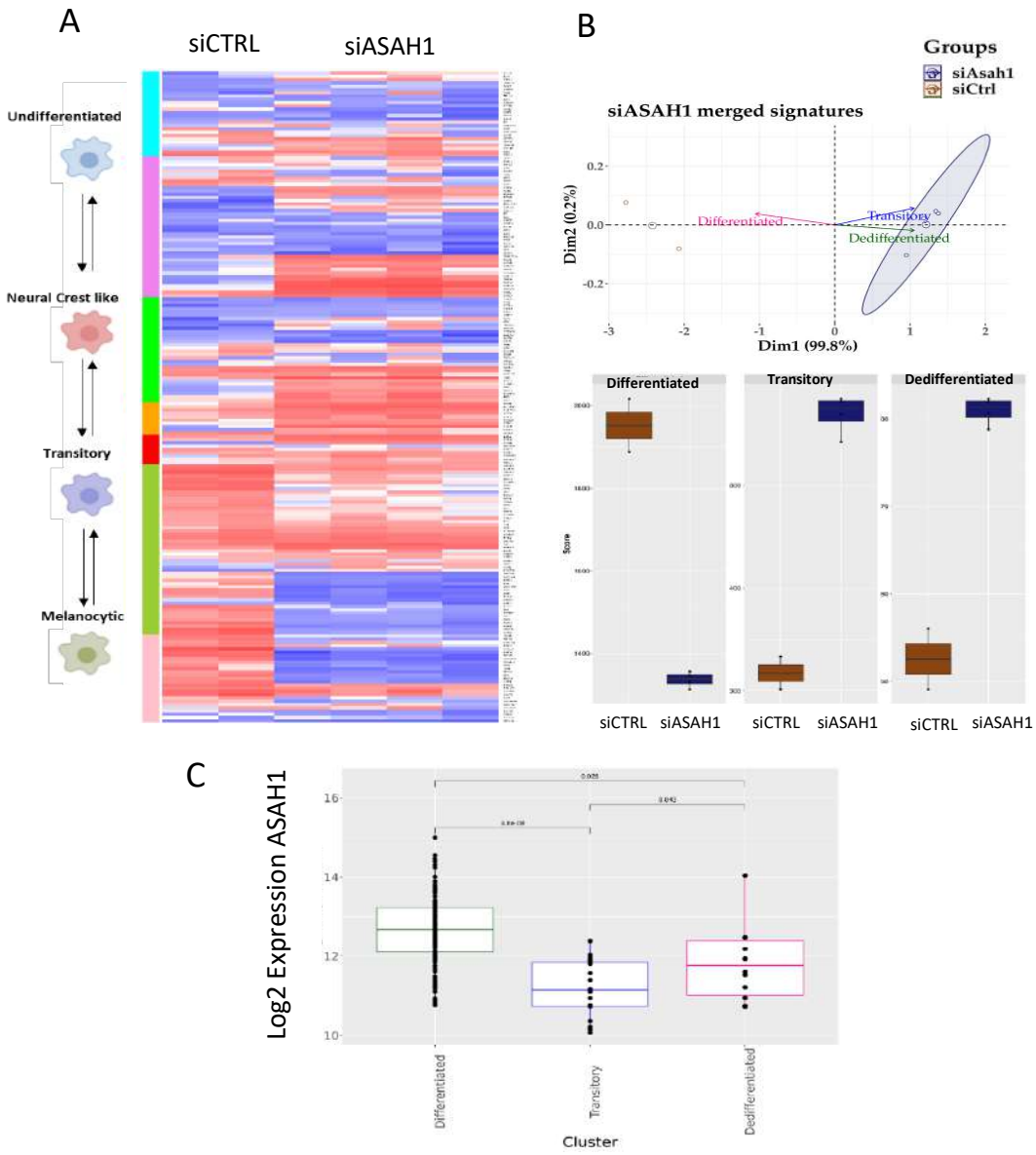


Figure 3: Downregulation of acid ceramidase induces melanoma cell dedifferentiation. WM35 melanoma cells were transfected with a control (siCTRL) or a siRNA targeting AC transcript (siASAH1) and analyzed by RNAseq 72h later. **(A)** Heatmap representing the gene expression of melanoma cells with a clustering based on the dedifferentiation signature published by Tsoi et al. **B,** PCA projection of our samples using our 3 merged dedifferentiation scores. **C,** *ASAH1* gene expression in tumours of melanoma metastatic patient from 3 cohorts (Gide et al., Riaz et al., Liu et al.,). Tumours were classified using our 3 different scores (T test).

To get insight into the common molecular mechanisms by which AC knockdown and TNF instigated melanoma cell dedifferentiation, we next compared the gene signatures obtained in WM35 melanoma cells treated with TNF for 24h and those generated in AC knockdown cells. We observed 28% of common genes, which were associated with various biological processes such as "regulation of cell differentiation", "hallmarks of epithelial-to-mesenchymal transition" and "biological adhesion" (Figure 4A). Viper algorithm was next used on both RNA-Seq data sets to infer transcription factor (TF) activities (Supplementary Figure 4). We identified 4 TF being upregulated (i.e., PPARα, IRF8, C/EBPβ and SMAD3), and two being downregulated (i.e., MITF and TCF7L2) in both AC knockdown cells and TNF-treated cells (Figure 4B). Of these factors, C/EBPβ, SMAD3 and MITF are directly related to melanoma dedifferentiation. Concerning MITF, a positive feedback loop between this TF and AC in the context of melanoma phenotype switching has already been observed [27]. However, the mechanism involved in MITF regulation by AC has not yet been elucidated.

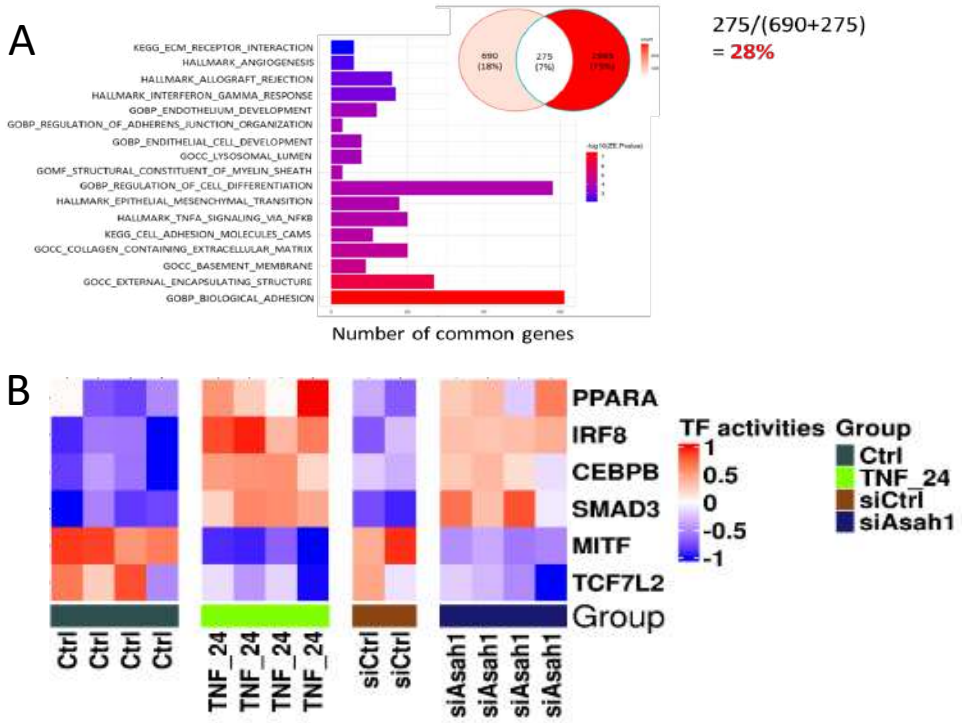


Figure 4: TNF treatment and Acid ceramidase downregulation share a common invasive program. (A) Visualisation of the signalling pathways significantly involved by the common differentially expressed genes between the TNF-treated conditions at 24 h and the siASAH1 transfected WM35 melanoma cells. For each pathway, the bar of the histogram indicates the number of common genes differentially expressed belonging to the described pathway. The colour of the bar represents the p-value (Zelen exact test); from blue (least significant) to red (most significant). Venn diagram illustrates the intersection between the significantly different gene list between control and TNF-treated samples at 24 h (left) and the significantly different gene list between siCtrl and siASAH1 samples (right). 28% of gene expression being modulated by TNF were commonly modulated upon AC knockdown. **(B)** Heatmap representing the significant activities of common transcription factors between TNF-treated samples at 24 h versus Ctrl and siASAH1 treated versus siCtrl.

We further evaluated the impact of AC knockdown on melanoma cell dedifferentiation at the protein level (Figure 5). AC knockdown, with three different siRNA sequences, decreased the expression of both MITF and its target Melan-A (Figures 5A and B). Moreover, AC knockdown increased the phosphorylation of MAPK (Figure 5C), which is known to enhance MITF proteasomal degradation [26]. Consequently, the inhibition of the MAPK pathway reversed the inhibition of Melan-A expression triggered by AC knockdown (Figure 5D).

Collectively, our data indicate that TNF-induced AC inhibition contributes to melanoma cell dedifferentiation, most likely by promoting MAPK activation and subsequent MITF proteasomal degradation.

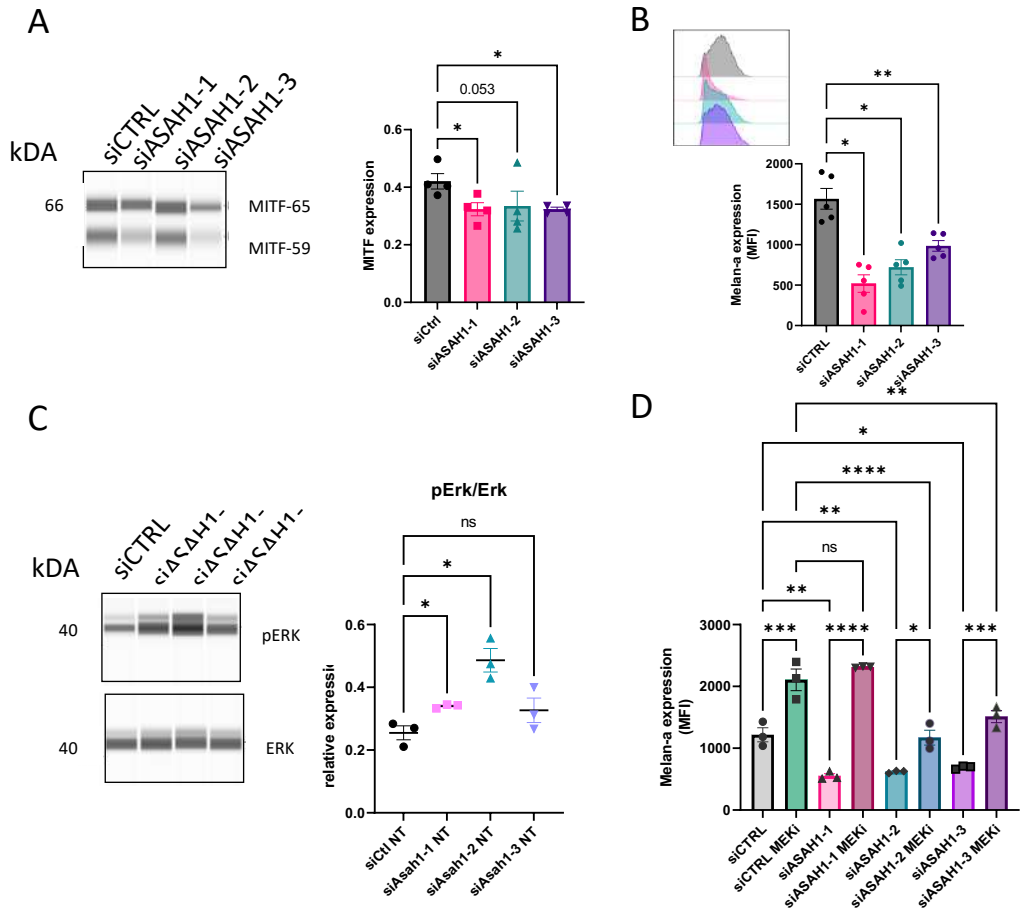


Figure 5: AC downregulation induces melanoma dedifferentiation through MAPK activation. WM35 cells were transfected with 3 different siRNA targeting AC transcripts. **A,** MITF protein expression was evaluated by simple Western. Data are represented by the mean expression of the 65kDa and 59kDa form (One-way ANOVA, * p<0,05, n=4). **B,** Melan-A expression was evaluated by flow cytometry. Insert: representative images. MFI: Median Fluorescence Intensity (One-way ANOVA, * p<0,05, ** p<0,01, n=5). **C,** ERK and p-ERK protein expression was evaluated by simple Western. Data are represented by the ratio of p-ERK/ERK expression. (One-way ANOVA, * p<0,05, n=3). **D,** WM35 cells were transfected with 3 different siRNA targeting AC transcripts and treated with 40 µM PD98059, a MEK inhibitor. Melan-A expression was evaluated by flow cytometry. MFI: Median Fluorescence Intensity (One-way Anova, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, ****p<0,0001, n=3). Data are means ± sem.

Acid ceramidase overexpression in A375 cells attenuates TNF-induced melanoma dedifferentiation.

To further evaluate the impact of AC in the melanoma dedifferentiation process induced by TNF, we transduced A375 melanoma cells, which expressed endogenous AC at low levels and exhibited low basal AC enzyme activity, with a vector encoding AC. AC overexpression significantly increased the AC specific enzyme activity (Supplementary Figure 5A). The A375 cells, overexpressing or not AC, were incubated with or without TNF for 24, 48 and 72 hours and RNA-Seq was performed (Figure 6A). TNF-untreated A375 melanoma cells exhibited a transitory phenotype and AC overexpression oriented the cells towards a more differentiated state (Figure 6B). Upon TNF treatment, A375 cells got dedifferentiated, this phenomenon being significantly attenuated by AC overexpression (Figure 6B).

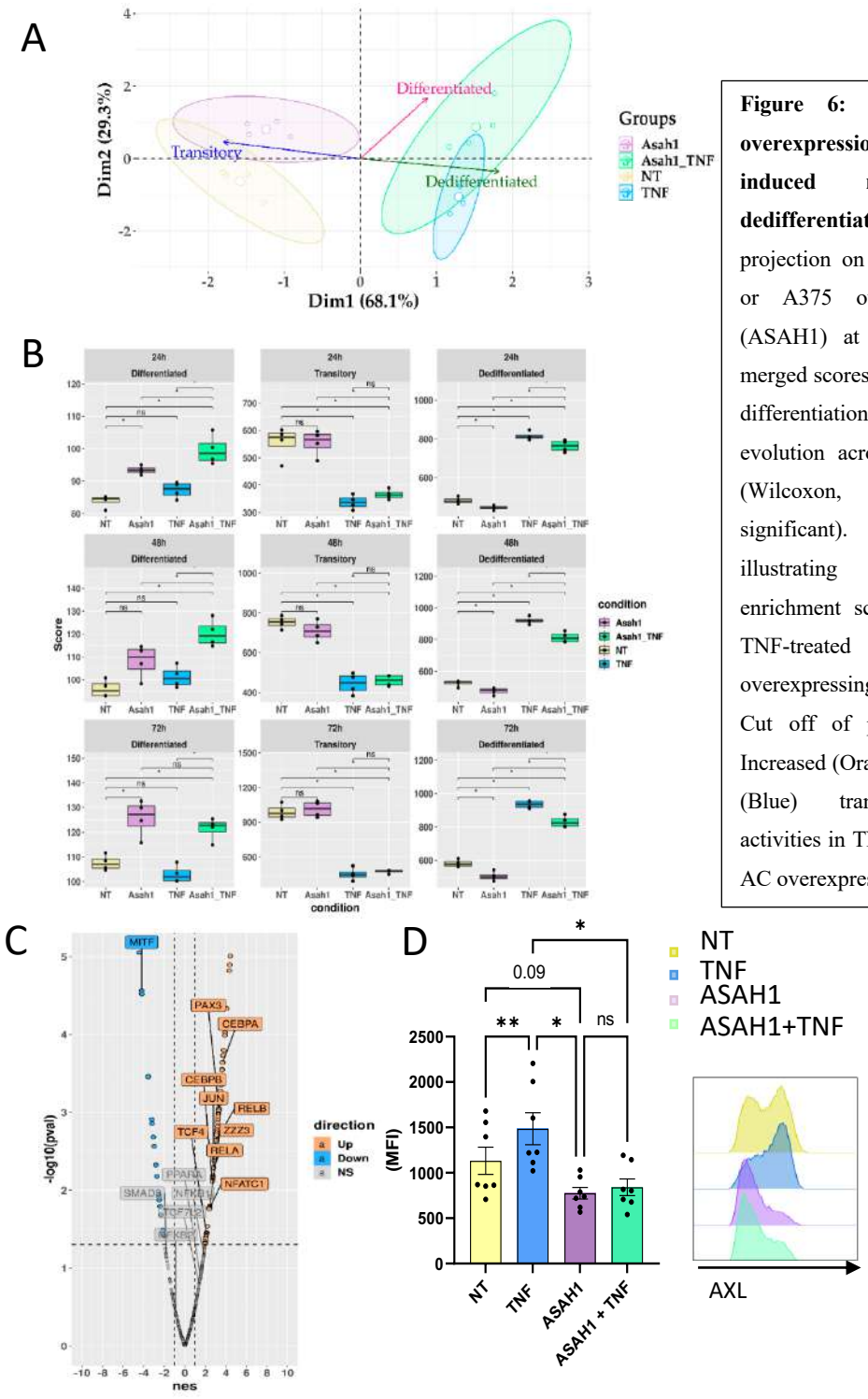


Figure 6: Acid ceramidase overexpression alleviates TNF-induced melanoma cell dedifferentiation. A, PCA projection on TNF-treated A375 or A375 overexpressing AC (ASAH1) at 24h using our 3 merged scores to evaluate the cell differentiation states. **B,** Score evolution across TNF treatment (Wilcoxon, *p<0.05; ns not significant). **C,** Volcano plot illustrating the normalized enrichment score (nes) between TNF-treated A375 and AC overexpressing A375 cells at 24h. Cut off of p-value was 0.05. Increased (Orange) and decreased (Blue) transcription factor activities in TNF-treated A375 vs AC overexpressing A375 cells.

Whereas the activity of TF known to be involved (including C/EBPβ) in the establishment of an invasive program was lower in AC overexpressing cells and, MITF activity was higher. (Figure 6C). This suggests that AC negatively modulates the implementation of an invasive/dedifferentiated program in A375 melanoma cells, in line with our data in WM35 cells (Figure 3). Accordingly, the expression of the tyrosine kinase AXL, which increased in melanoma cells during dedifferentiation, was upregulated in TNF-treated A375 cells, and this was abolished in AC overexpressing A375 melanoma cells (Figure 6D). AC overexpression significantly impaired TNF-induced *SMAD3* gene expression as evaluated by RT-qPCR

(supplementary figure 5). Collectively, our data indicate that AC overexpression impairs TNF-induced melanoma dedifferentiation.

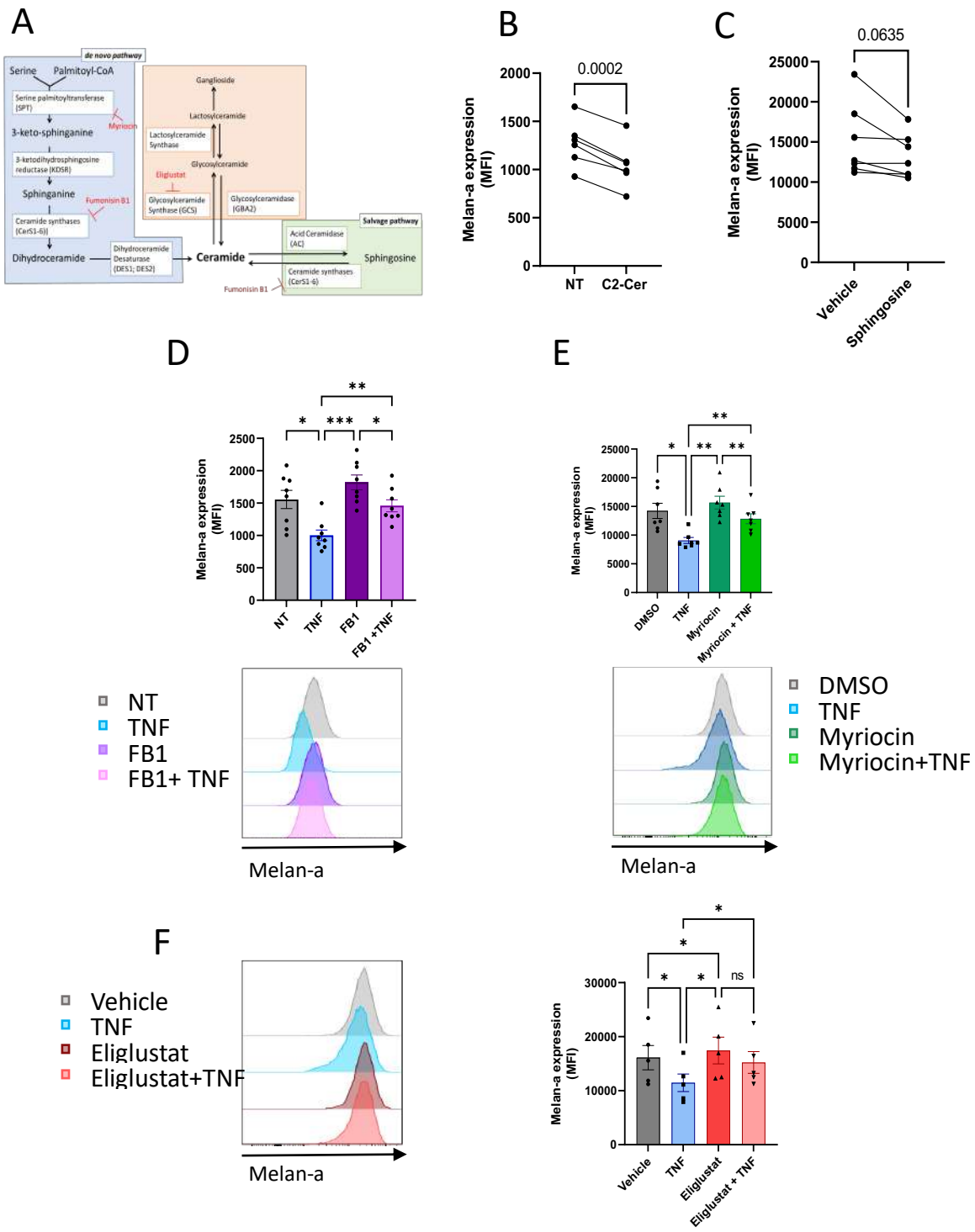
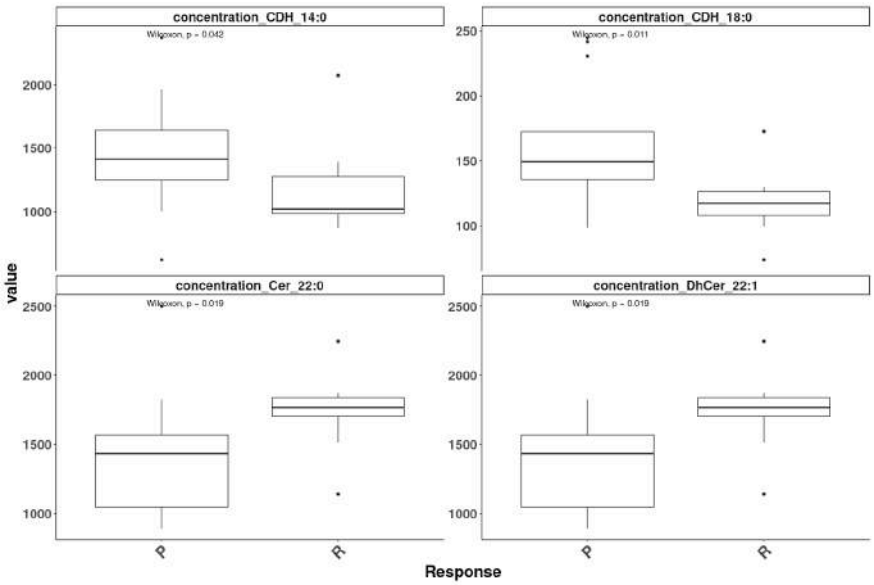


Figure 7: Targeting sphingolipid synthesis impairs TNF-induced melanoma cell dedifferentiation. A, Sphingolipid metabolism scheme with the different inhibitors used (in red). **B and C,** WM35 cells were treated with exogenous C2-ceramide (10 µM) for 24h (B) or exogenous sphingosine (10 µM) for 48h and Melan-A expression was evaluated by flow cytometry (N=6; Paired T Test)**. D-F,** WM35 cells were treated with TNF (50 ng/mL) for 48h in combination, or not, with the ceramide synthase inhibitor Fumonisin B1 (5 µM) (D), the serine palmitoyl coA transferase inhibitor Myriocin (10 µM) (E), the glucosylceramide synthase inhibitor eliglustat (10 µM) (F). Melan-A expression was evaluated by flow cytometry. Inserts: representative images. MFI: Median Fluorescence Intensity. Data are means means ± sem (n=5-8; Paired T Test, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

Targeting sphingolipid synthesis impairs TNF-induced melanoma cell dedifferentiation.
To further evaluate the role of ceramide metabolism in melanoma cell dedifferentiation process upon TNF treatment, we incubated the WM35 melanoma cell line with exogenous ceramides or sphingosine and with various inhibitors of SL-metabolizing enzymes (Figure 7A). Under our experimental conditions, exogenous ceramides significantly reduced the Melan-A expression (Figure 7B). A similar trend, albeit to a lesser extent, was observed when cells were incubated with exogenous sphingosine (Figure 7C). This indicates that ceramide, or its metabolites, might be involved in melanoma cell dedifferentiation. Conversely, incubating melanoma cell lines in the presence of Fumonisin B1 (FB1), which prevents the *de novo* sphingolipid synthesis by inhibiting the ceramide synthases [51], prevented the loss of Melan-A expression upon TNF treatment (Figure 7D). Similar findings were observed with myriocin, which inhibits the SPT enzymes [52], known to catalyze the condensation between serine and palmitoyl-CoA to form sphinganine, the precursor for *de novo* sphingolipid synthesis (Figure 7E). Finally, eliglustat, an inhibitor of the glucosylceramide synthase (GCS) [53], had similar effects as FB1 and myriocine, preventing TNF-induced Melan-A decrease in melanoma cells (Figure 7F).
Our data indicate that TNF triggers ceramide metabolite accumulation, including glycosphingolipids, which likely contribute to melanoma cell dedifferentiation.

Plasma ceramide metabolites predict resistance to immune checkpoint inhibitors in advanced melanoma patients.
Despite the huge progress for the care of advanced melanoma patients thanks to immune checkpoint inhibitor administration, around half of the patients do not respond to this immunotherapy. So far, the best therapeutic response can be achieved with the ipilimumab and nivolumab combination [1]. Identification of resistance biomarkers to immune checkpoint inhibitors is urgently needed to better stratify patients for therapy.
We took advantage of the clinical trial MELANFα (NCT03348891) in advanced melanoma patients treated with immune checkpoint inhibitors. This trial is a translational proof-of-concept, open-label, prospective, multicenter, aiming to identify the clinical markers and/or biomarkers associated with therapeutic response to immune checkpoints inhibitors, in patients with advanced melanoma. The first results of this study have been communicated at the ASCO congress in September 2022 and are about to be submitted for publication. In this clinical trial, between September 2018 and November 2020, 25 patients treated with ipilimumab and nivolumab were included. To evaluate whether ceramide metabolite plasma levels can predict the clinical outcome in patients at week 12, ceramide metabolites were assessed by mass spectrometry at baseline and week 6 post-treatment induction (Figure 8). C14:0 and C18:0 dihexosylceramide (most likely lactosylceramides) plasma levels were higher at baseline and at week 6 in non-responders than in responders (Figure 8A). In addition, C22:0 dihexosylceramide and total dihexosylceramide as well as C16:0 and C18:0 trihexosylceramides plasma levels were higher in non-responders at week 6 (Figure 8B). Finally, C22:0 ceramides and C22:1 dihydroceramides were higher in responders at baseline (Figure 8A).
Collectively, our data indicate that glycosphingolipid pattern in plasma can predict the clinical outcome of advanced melanoma treated with ipilimumab and nivolumab.

A



B

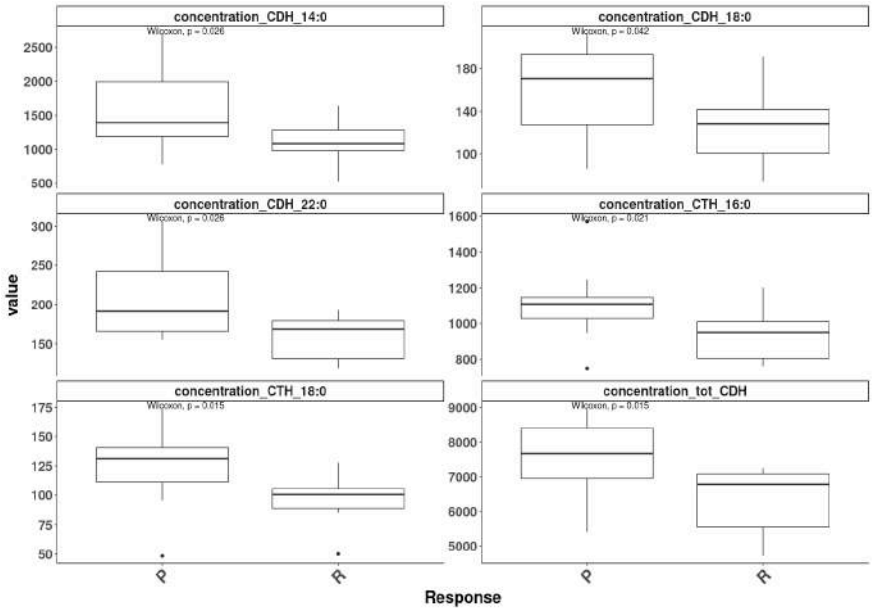


Figure 8: Plasma ceramide metabolites predict resistance to immune checkpoint inhibitors in advanced melanoma patients. Ceramide metabolite plasma levels were measured in advanced melanoma patients treated with ipilimumab (anti-CTLA-4) and nivolumab (anti-PD-1) at baseline **(A)** and week 6 post-treatment induction **(B)**. P: progressors; R: responders

Discussion

In the present study, we report that TNF-induced ceramide metabolism changes contributes to melanoma cell dedifferentiation process, which facilitates melanoma progression and resistance to immunotherapies [12]. Among the metabolic pathways, we identified the AC inhibition as well as the *de novo* synthesis pathways as being triggered by TNF. Finally, we observed that dihexosylceramides are increased in the plasma of non-responder melanoma patients treated with ipilimumab and nivolumab, indicating that ceramide metabolism alterations may contribute to resistance to immunotherapy targeting immune checkpoints such as PD-1 and CTLA-4.

The role of AC in melanoma has been already investigated in the literature. On the one hand, AC is likely involved in melanoma cell proliferation and tumor growth *in vivo*. First, AC expression is highly expressed in proliferative melanoma cell lines [27, 54]. Second, AC knockdown in melanoma cells reduces tumor growth *in vivo* [55]. Finally, a complete AC ablation by a CRISPR/Cas9 technique in the A375 melanoma cell line leads to ceramide accumulation, cell cycle arrest in G1/S, senescence and apoptosis [50, 56]. Thus, AC seems to be important for melanoma cell survival and proliferation. On the other hands, AC expression is lower in invasive cells as compared to proliferating cells. On tumor biopsy sections, its expression is greater at the level of the superficial sites than in the invasive zones [27]. RNA interference experiments decreasing the expression of AC by melanoma cells increase their migration capacities. Thus, low AC expression is associated with a more invasive phenotype of melanoma cells [27].

To the best of our knowledge, whereas AC has been reported to modulate proinflammatory and cytotoxic TNF signaling pathways in different cell types [19, 57, 58], the present study is the first showing that TNF-induced AC inhibition contributes to melanoma cell dedifferentiation process. The mechanism by which TNF decreases AC expression likely involves the inhibition of MITF, which has been identified to target *ASAH1* promoter sequence [27]. AC inhibition may contribute to maintain the dedifferentiation phenotype of melanoma cells, by enhancing the activation of ERK, which phosphorylates and promotes MITF proteasomal degradation [59]. This tenet is supported by the increased ERK phosphorylation and decreased MITF expression in AC knockdown melanoma cells. Furthermore, AC knockdown-induced MELAN-A expression decrease was abolished in the presence of MEK inhibitors. Conversely, AC overexpression in A375 melanoma cells, which expressed endogenous AC at low levels, partially impairs melanoma cell dedifferentiation upon TNF treatment. In good agreement with the study published by Lai et al [50], where the rescue of AC expression in *ASAH1*-deficient A375 cells resulted in an increased *MITF* gene expression, transcription factor inference indicated a significant increase in MITF activity in AC overexpressing A375. The latter result further supported that AC activity contributes to stimulate MITF, possibly by reducing ceramide levels and MAPK activation. In addition, AC overexpression in A375 attenuated the activity or the expression of other TF such as c-jun, C/EBPα, C/EBPβ, RelA, RelB and SMAD3 upon TNF treatment. At the opposite, AC knockdown in WM35 cells was sufficient to enhance the activity of C/EBPβ and SMAD3 activities. Our findings are in line with studies indicating that C/EBPβ, which is activated by exogenous ceramides [60] in an ERK-dependent manner [61], represses the MITF transcription in melanoma [62]. Moreover, endogenous ceramides were shown to stimulate the TGFβ/SMAD3 signalling pathway [63]. Thus, TNF-induced ceramide metabolism changes likely contribute to melanoma dedifferentiation and aggressiveness.

The alterations of ceramide metabolism upon TNF in melanoma cells are unlikely restricted to the AC inhibition. Indeed, we observed an increase in sphingolipid *de novo* synthesis, leading to the accumulation of dihydroceramides, ceramides, dihydrosphingomyelins, sphingomyelins, monohexosylceramides and dihexosylceramides. Incubation of melanoma cells with subtoxic

ceramide concentrations triggered cell dedifferentiation. Conversely, blocking *de novo* ceramide synthesis impair TNF-induced melanoma cell dedifferentiation. This implies that ceramides or ceramide metabolites are responsible for melanoma cell dedifferentiation process. Our findings are in line with a previous report showing that acid sphingomyelinase enhances MAPK activation and proteasomal degradation of MITF in melanoma [26]. The role of ceramide metabolism in TNF-induced melanoma cell dedifferentiation is further documented by the inhibition of this process by fumonisin B1, myriocin and eliglustat. This indicates that *de novo* ceramide synthesis as well as ceramide metabolism towards glycosphingolipids contribute to melanoma cell dedifferentiation upon TNF. Thus, glucosylceramide synthase can represent a good target in melanoma to prevent TNF-induced melanoma immune escape and progression. Accordingly, targeting glucosylceramide synthase by epigenetic or pharmacological approaches reduces the glucosylceramide and ganglioside content of MEB4 mouse melanoma cells without affecting cell proliferation and viability *in vitro*. However, it greatly impaired the tumor progression in immunocompetent mice [64]. Whereas the impact of glucosylceramide synthase inhibition on the immune response remains to be evaluated, it is tempting to speculate that targeting the glucosylceramide synthase prevents melanoma cell dedifferentiation, thus contributing to enhance immune response towards melanoma cells.

We identified dihexosylceramides, most likely lactosylceramides, as being significantly higher in the plasma of non-responder melanoma patients as compared to responders to the combination of ipilimumab and nivolumab. Whereas plasma dihexosylceramides do not necessarily derived from melanoma tumors, it is tempting to speculate that part of them is produced by melanoma cells, possibly as a consequence of TNF signalling in melanoma tumours. Indeed, we found that (i) various melanoma cell lines contained lactosylceramide at high levels [65] and (ii) TNF increased the lactosylceramide production in WM35 melanoma cells as depicted in Figure 2. The production of lactosylceramide by melanoma cells was shown to favor melanoma aggressiveness. For instance, the lactosylceramide synthase β4GalT5 of B16F10 mouse melanoma cells contribute to melanoma progression in mice [66]. In addition, gangliosides, which derived from lactosylceramides, are characteristic of aggressive melanomas [67]. Whether or not plasma SL are relevant biomarkers for patients treated with ICI will be further evaluated in the context of the Immusphinx clinical trial (NCT03627026), the primary objective of which is to determine SL signatures predicting resistance/response to ICI in advanced melanoma patients.

Collectively, our study highlights for the first time that ceramide metabolism alterations contribute to TNF-induced melanoma cell dedifferentiation and opens new avenues for developing original therapeutic strategies aiming at reducing melanoma progression and resistance to therapies.

Acknowledgement

The authors are grateful to the flow cytometry, transcriptomic and protein analyses facilities of the I2MC (INSERM U1048, Toulouse, France) and CRCT (INSERM U1037, Toulouse, France) for their technical assistance. They thank S. Carpentier (INSERM U1037, Toulouse, France) for technical assistance. They thank Drs. Olivier Micheau (INSERM U1231, Dijon, France), Olivier Joffre (INSERM U1291, Toulouse, France) for fruitful discussions.

This work was supported by INSERM, Paul Sabatier University (Toulouse III), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC, Equipe Labellisée 2019 et 2022), Fondation Toulouse Cancer Santé. We thank the CARe graduate school support for Matthieu Genais and Benjamin Jung. We thank the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), which funded the 4th year of Carine Dufau's PhD studies.

Conflict of interest

N. Meyer reports grants and personal fees from Bristol-Myers Squibb and MSD, and personal fees from Roche, Novartis, Pierre Fabre, Sanofi, Sun Pharma, and AbbVie outside the submitted work. B. Ségui reports grants and personal fees from Bristol-Myers Squibb outside the submitted work. B. Ségui, C. Dufau, M. Genais, A. Montfort, T. Levade, N. Meyer and N. Andrieu-Abadie declare a patent pending (application number: EP22306318; filled in Sept 6, 2022). No disclosures were reported by the other authors.

References

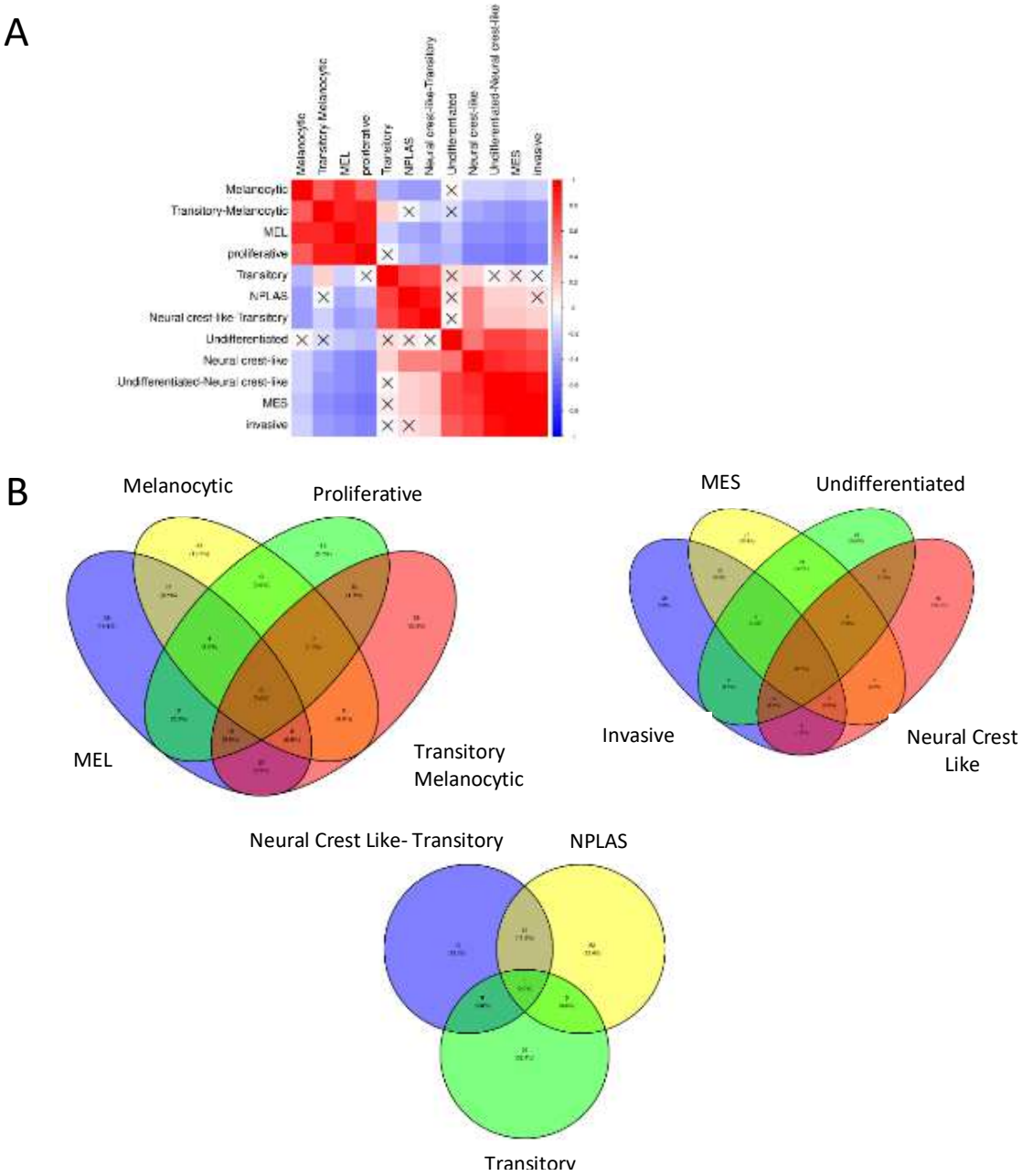
1. Larkin, J., et al., Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. N Engl J Med, 2019. 381(16): p. 1535-1546.
2. Lesage, C., et al., Incidence and Clinical Impact of Anti-TNFalpha Treatment of Severe Immune Checkpoint Inhibitor-induced Colitis in Advanced Melanoma: The Mecolit Survey. J Immunother, 2019. 42(5): p. 175-179.
3. Bertrand, F., et al., Blocking Tumor Necrosis Factor alpha Enhances CD8 T-cell-Dependent Immunity in Experimental Melanoma. Cancer Res, 2015. 75(13): p. 2619-28.
4. Bertrand, F., et al., TNFalpha blockade overcomes resistance to anti-PD-1 in experimental melanoma. Nat Commun, 2017. 8(1): p. 2256.
5. Perez-Ruiz, E., et al., Prophylactic TNF blockade uncouples efficacy and toxicity in dual CTLA-4 and PD-1 immunotherapy. Nature, 2019. 569(7756): p. 428-432.
6. Montfort, A., et al., Combining Nivolumab and Ipilimumab with Infliximab or Certolizumab in Patients with Advanced Melanoma: First Results of a Phase Ib Clinical Trial. Clin Cancer Res, 2021. 27(4): p. 1037-1047.
7. Montfort, A., et al., The TNF Paradox in Cancer Progression and Immunotherapy. Front Immunol, 2019. 10: p. 1818.
8. Balkwill, F., Tumour necrosis factor and cancer. Nat Rev Cancer, 2009. 9(5): p. 361-71.
9. Chen, X., et al., Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. J Immunol, 2007. 179(1): p. 154-61.
10. Schioppa, T., et al., B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF-alpha during squamous carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(26): p. 10662-7.
11. Zhao, X., et al., TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. J Clin Invest, 2012. 122(11): p. 4094-104.
12. Landsberg, J., et al., Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. Nature, 2012. 490(7420): p. 412-6.
13. Hoek, K.S., et al., Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. Pigment Cell Res, 2006. 19(4): p. 290-302.
14. Sensi, M., et al., Human cutaneous melanomas lacking MITF and melanocyte differentiation antigens express a functional Axl receptor kinase. J Invest Dermatol, 2011. 131(12): p. 2448-57.
15. Muller, J., et al., Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. Nat Commun, 2014. 5: p. 5712.
16. Schutze, S., et al., TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. Cell, 1992. 71(5): p. 765-76.
17. Segui, B., et al., Involvement of FAN in TNF-induced apoptosis. J Clin Invest, 2001. 108(1): p. 143-51.
18. Alvarez, S.E., et al., Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. Nature, 2010. 465(7301): p. 1084-8.

19. Zeidan, Y.H., et al., Acid ceramidase but not acid sphingomyelinase is required for tumor necrosis factor-{alpha}-induced PGE2 production. J Biol Chem, 2006. 281(34): p. 24695-703.
20. Mandala, S., et al., Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. Science, 2002. 296(5566): p. 346-9.
21. Wang, W., M.H. Graeler, and E.J. Goetzl, Physiological sphingosine 1-phosphate requirement for optimal activity of mouse CD4+ regulatory T Cells. FASEB J, 2004. 18(9): p. 1043-5.
22. Manguso, R.T., et al., In vivo CRISPR screening identifies Ptpn2 as a cancer immunotherapy target. Nature, 2017. 547(7664): p. 413-418.
23. Albinet, V., et al., Dual role of sphingosine kinase-1 in promoting the differentiation of dermal fibroblasts and the dissemination of melanoma cells. Oncogene, 2014. 33(26): p. 3364-73.
24. Imbert, C., et al., Resistance of melanoma to immune checkpoint inhibitors is overcome by targeting the sphingosine kinase-1. Nat Commun, 2020. 11(1): p. 437.
25. Montfort, A., et al., Neutral Sphingomyelinase 2 Heightens Anti-Melanoma Immune Responses and Anti-PD-1 Therapy Efficacy. Cancer Immunol Res, 2021. 9(5): p. 568-582.
26. Bizzozero, L., et al., Acid sphingomyelinase determines melanoma progression and metastatic behaviour via the microphtalmia-associated transcription factor signalling pathway. Cell Death Differ, 2014. 21(4): p. 507-20.
27. Leclerc, J., et al., Lysosomal acid ceramidase ASAH1 controls the transition between invasive and proliferative phenotype in melanoma cells. Oncogene, 2018.
28. Li, B. and C.N. Dewey, RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics, 2011. 12(1): p. 323.
29. Love, M.I., W. Huber, and S. Anders, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol, 2014. 15(12): p. 550.
30. Ycart, B., F. Pont, and J.J. Fournie, Curbing false discovery rates in interpretation of genome-wide expression profiles. J Biomed Inform, 2014. 47: p. 58-61.
31. Tosolini, M., et al., Large-scale microarray profiling reveals four stages of immune escape in non-Hodgkin lymphomas. Oncoimmunology, 2016. 5(7): p. e1188246.
32. Tsoi, J., et al., Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. Cancer Cell, 2018. 33(5): p. 890-904 e5.
33. Andrews, M.C., et al., Multi-modal molecular programs regulate melanoma cell state. Nat Commun, 2022. 13(1): p. 4000.
34. Harrell, F.E., Hmisc: Harrell Miscellaneous. R package version 4.6-0. 2021.
35. Gide, T.N., et al., Distinct Immune Cell Populations Define Response to Anti-PD-1 Monotherapy and Anti-PD-1/Anti-CTLA-4 Combined Therapy. Cancer Cell, 2019. 35(2): p. 238-255 e6.
36. Riaz, N., et al., Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab. Cell, 2017. 171(4): p. 934-949 e16.
37. Liu, D., et al., Integrative molecular and clinical modeling of clinical outcomes to PD1 blockade in patients with metastatic melanoma. Nat Med, 2019. 25(12): p. 1916-1927.
38. Hanzelmann, S., R. Castelo, and J. Guinney, GSVA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data. BMC Bioinformatics, 2013. 14: p. 7.
39. Garcia-Alonso, L., et al., Benchmark and integration of resources for the estimation of human transcription factor activities. Genome Res, 2019. 29(8): p. 1363-1375.
40. Alvarez, M.J., et al., Functional characterization of somatic mutations in cancer using network-based inference of protein activity. Nat Genet, 2016. 48(8): p. 838-47.

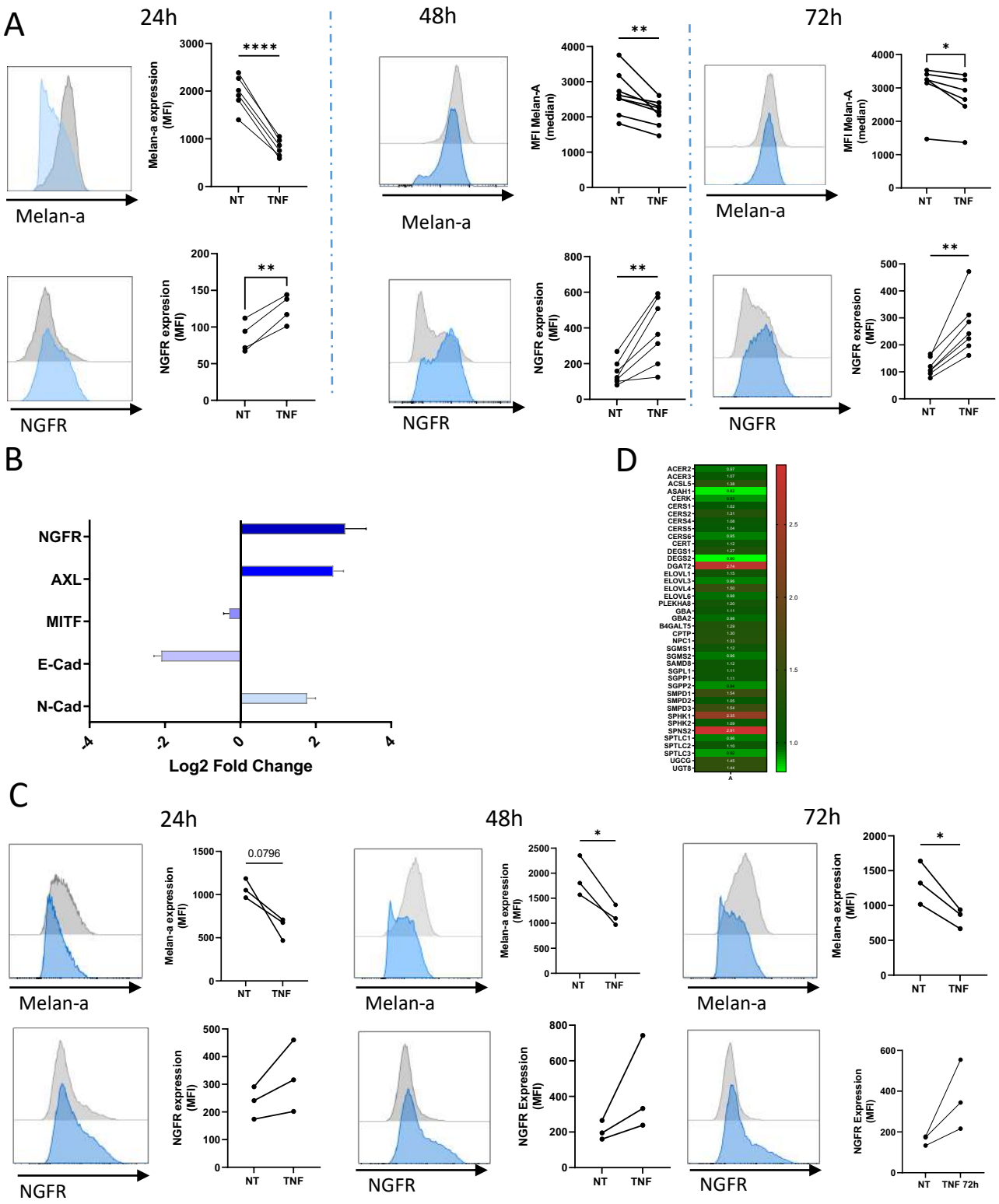
41. Leek, J.T.J., W. E.; Parker, H. S.; Fertig, E. J.; Jaffe, A. E.; Zhang, Y.; Storey, J. D.; Collado Torres, L., sva: Surrogate Variable Analysis. R package version 3.42.0. 2021.
42. Le, S.J., J.; Husson, F., FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. Journal of Statistical Software, 2008. 25(1): p. 1.
43. Kassambara, A.M., F., factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7. 2020.
44. Wei, T.S., V., R package 'corrplot': Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.92). 2021.
45. Wickham, H., ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. 2016: Springer-Verlag New York.
46. Gu, Z., R. Eils, and M. Schlesner, Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. Bioinformatics, 2016. 32(18): p. 2847-9.
47. Bedia, C., et al., Synthesis of a novel ceramide analogue and its use in a high-throughput fluorogenic assay for ceramidases. Chembiochem, 2007. 8(6): p. 642-8.
48. Merrill, A.H., Jr., et al., Sphingolipidomics: high-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Methods, 2005. 36(2): p. 207-24.
49. Bilal, F., et al., Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry Method to Study Sphingolipid Metabolism Changes in Response to CD95L. Methods Mol Biol, 2017. 1557: p. 213-217.
50. Lai, M., et al., Complete Acid Ceramidase ablation prevents cancer-initiating cell formation in melanoma cells. Sci Rep, 2017. 7(1): p. 7411.
51. Wang, E., et al., Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with Fusarium moniliforme. J Biol Chem, 1991. 266(22): p. 14486-90.
52. Miyake, Y., et al., Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. Biochem Biophys Res Commun, 1995. 211(2): p. 396-403.
53. Cox, T.M., et al., Eliglustat maintains long-term clinical stability in patients with Gaucher disease type 1 stabilized on enzyme therapy. Blood, 2017. 129(17): p. 2375-2383.
54. Realini, N., et al., Acid Ceramidase in Melanoma: EXPRESSION, LOCALIZATION, AND EFFECTS OF PHARMACOLOGICAL INHIBITION. J Biol Chem, 2016. 291(5): p. 2422-34.
55. Malvi, P., et al., N-acylsphingosine amidohydrolase 1 promotes melanoma growth and metastasis by suppressing peroxisome biogenesis-induced ROS production. Mol Metab, 2021. 48: p. 101217.
56. Lai, M., et al., Ablation of Acid Ceramidase Impairs Autophagy and Mitochondria Activity in Melanoma Cells. Int J Mol Sci, 2021. 22(6).
57. Strelow, A., et al., Overexpression of acid ceramidase protects from tumor necrosis factor-induced cell death. J Exp Med, 2000. 192(5): p. 601-12.
58. Ullio, C., et al., Sphingosine mediates TNFalpha-induced lysosomal membrane permeabilization and ensuing programmed cell death in hepatoma cells. J Lipid Res, 2012. 53(6): p. 1134-43.
59. Wu, M., et al., c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. Genes Dev, 2000. 14(3): p. 301-12.
60. Cho, Y.H., C.H. Lee, and S.G. Kim, Potentiation of lipopolysaccharide-inducible cyclooxygenase 2 expression by C2-ceramide via c-Jun N-terminal kinase-mediated activation of CCAAT/enhancer binding protein beta in macrophages. Mol Pharmacol, 2003. 63(3): p. 512-23.

61. Giltiay, N.V., et al., Ceramide- and ERK-dependent pathway for the activation of CCAAT/enhancer binding protein by interleukin-1beta in hepatocytes. J Lipid Res, 2005. 46(11): p. 2497-505.
62. Swoboda, A., et al., STAT3 promotes melanoma metastasis by CEBP-induced repression of the MITF pathway. Oncogene, 2021. 40(6): p. 1091-1105.
63. Sato, M., et al., Modulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by endogenous sphingolipid mediators. J Biol Chem, 2003. 278(11): p. 9276-82.
64. Weiss, M., et al., Inhibition of melanoma tumor growth by a novel inhibitor of glucosylceramide synthase. Cancer Res, 2003. 63(13): p. 3654-8.
65. Bilal, F., et al., Sphingomyelin Synthase 1 (SMS1) Downregulation Is Associated With Sphingolipid Reprogramming and a Worse Prognosis in Melanoma. Front Pharmacol, 2019. 10: p. 443.
66. Shirane, K., et al., Gene expression levels of beta4-galactosyltransferase 5 correlate with the tumorigenic potentials of B16-F10 mouse melanoma cells. Glycobiology, 2014. 24(6): p. 532-41.
67. Hamamura, K., et al., Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(31): p. 11041-6.

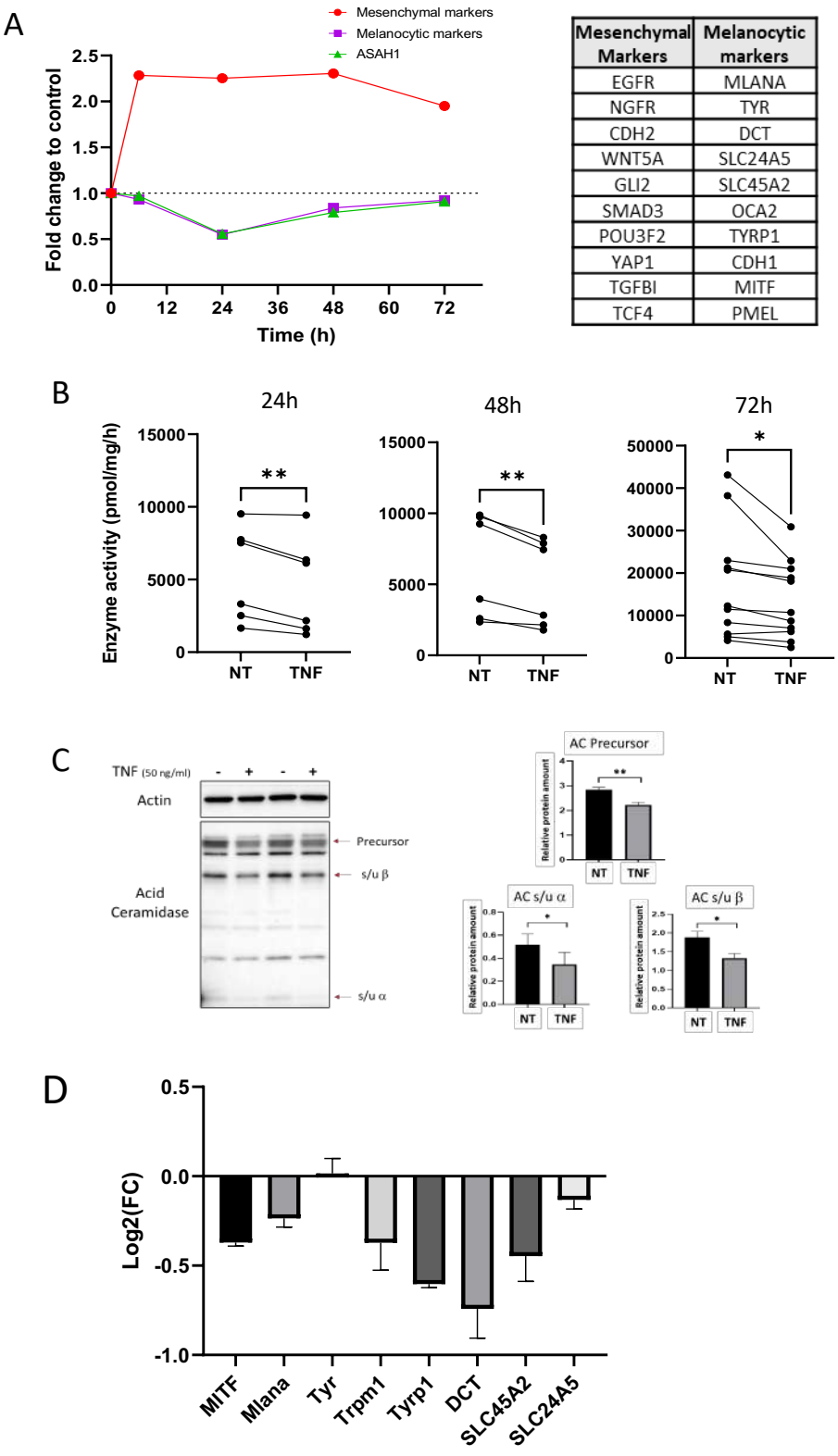
Supplementary data



Supplementary Figure 1: Literature-based gene signature analysis to evaluate melanoma differentiation states. A, Correlation plot (Spearman) across various dedifferentiation signatures (see methods) on public melanoma patient cohorts (Gide et al., Riaz et al., Liu et al.). Signatures were clustered using unsupervised hierarchical clustering. Crosses represent non-significant correlations; Blue=negative correlations; Red=positive correlations. **B,** Venn diagrams illustrating gene set intersection across highly correlated scores based on (A).

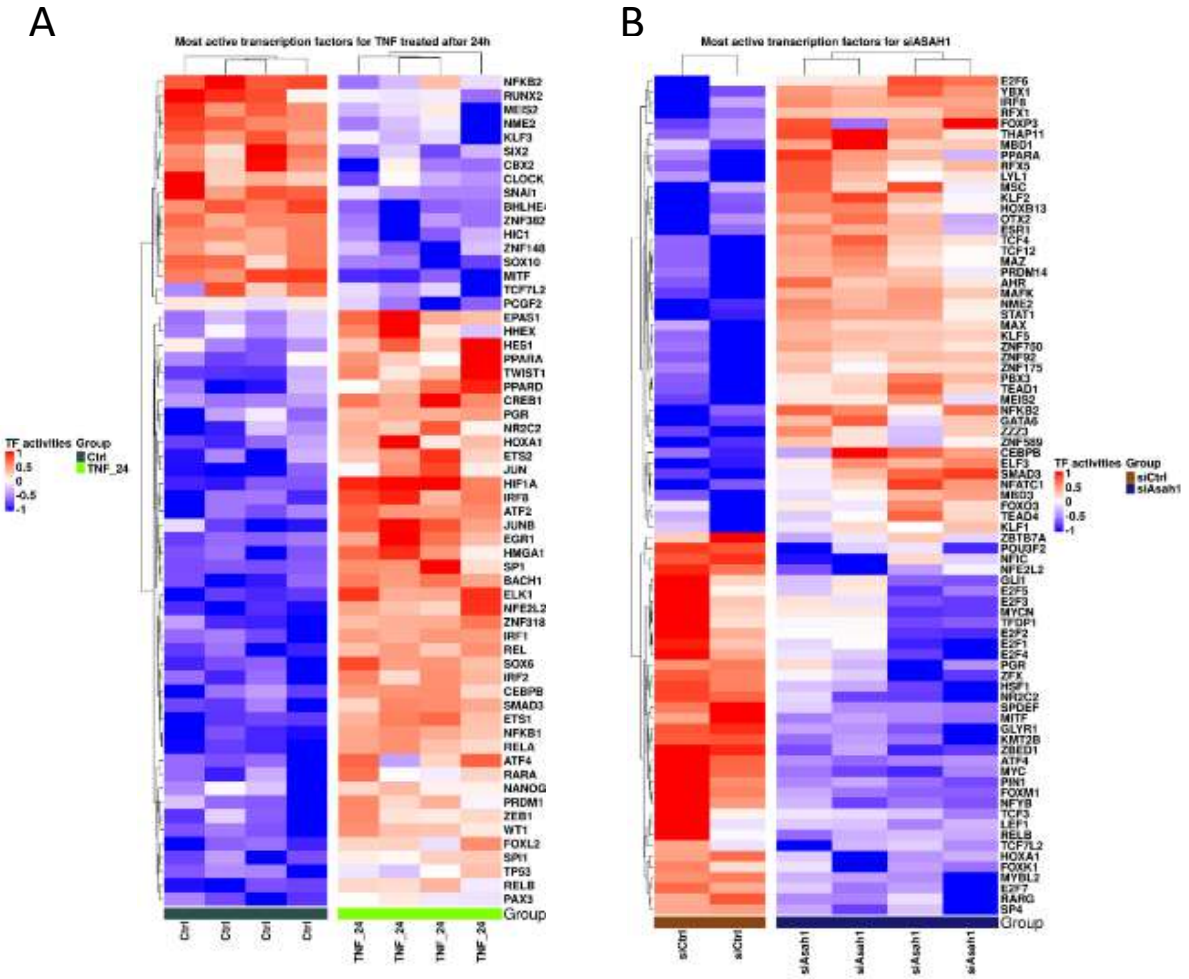


Supplementary Figure 2: TNF induces melanoma cell dedifferentiation of WM35 and WM9 cells. WM35 **(A)** or WM9 **(B-D)** were treated with 50 ng/mL TNF for 24h, 48h or 72h. **(A)** Melan-A and NGFR expression were evaluated by flow cytometry. Inserts: representative histograms. MFI: Median Fluorescence Intensity (Paired T Test, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$, n=4-7). **B,** Mesenchymal markers (NGFR, AXL, N-Cadherin) and melanocytic markers (MITF, E-Cadherin) gene expression was evaluated by RT-qPCR. Data are represented by Log2(Fold Change) in TNF-treated cells as compared to control cells. **C,** Melan-A and NGFR expression were evaluated by flow cytometry. Inserts: representative histograms. MFI: Median Fluorescence Intensity (Paired T Test, * $p<0.05$, n=3). **D,** PCR Array targeting sphingolipid metabolism genes on WM9 treated with 50 ng/mL TNF. Data are represented by Log2(FC) (n=2).

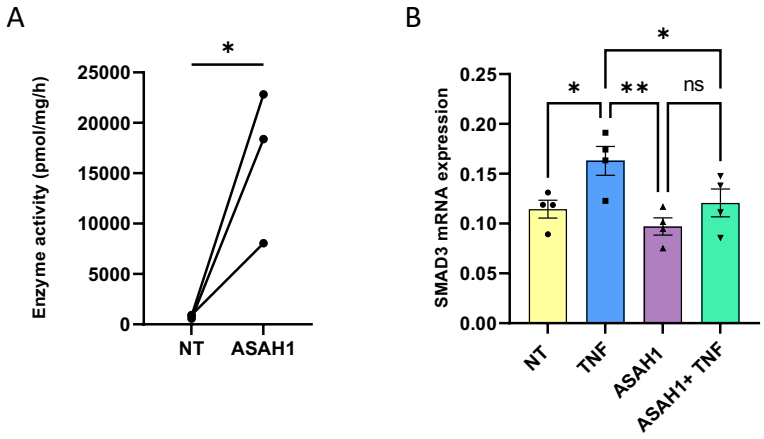


Mesenchymal Markers	Melanocytic markers
EGFR	MLANA
NGFR	TYR
CDH2	DCT
WNT5A	SLC24A5
GLI2	SLC45A2
SMAD3	OCA2
POU3F2	TYRP1
YAP1	CDH1
TGFBI	MITF
TCF4	PMEL

Supplementary figure 3: TNF decreases acid ceramidase expression and activityA, *ASAH1*, mesenchymal markers and melanocytic markers gene expression profile upon 50 ng/mL TNF treatment (6h, 24h, 48h, 72h). Data are represented by the fold change compared to untreated cells. Mesenchymal markers and melanocytic marker data represent the mean expression of the gene list presented in the table. **B,** Enzymatic assay of acid ceramidase activity in WM35 melanoma cells treated with 50 ng/mL TNF during 24h, 48h or 72h. Data are means ± sem (* $p<0.05$, **** $p<0.0001$, Paired T Test, n=6 for 24h and 48h, n=11 for 72h). **C,** Acid ceramidase protein expression in WM35 melanoma cells treated with 50 ng/mL of TNF during 72h. Representative Western Blot of 3 independent experiments. (**p<0,01, *p<0,05, Student t Test, n=3). (D) WM35 cells were transfected with siASAH1-3 and MITF and its target gene expression were evaluated by RT-qPCR. Data are represented by log2(Fold Change) as compared to control (n=3).



Supplementary figure 4. Transcription factor activities in TNF-treated and AC knockdown WM35 melanoma cells. Heatmap representing significant activities of transcription factors in TNF-treated WM35 melanoma cells at 24 h vs control (Ctrl) (A) and AC knockdown WM35 melanoma cells (siASAH1) vs control (siCTRL) (B).



Supplementary figure 5. Impact of acid ceramidase overexpression in A375 melanoma cells. A, Acid ceramidase enzyme activity in parental A375 cells (not transduced: NT) or AC overexpressing A375 cells (ASAH1) (T Test, *p<0.05, n=3). **B,** Parental A375 cells (NT) or AC overexpressing A375 cells (ASAH1) were treated with 50 ng/mL TNF for 24h and then *SMAD3* expression was evaluated by RT-qPCR (One-way ANOVA, *p<0.05, **p<0.01, n=4).

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif de ma thèse était d'étudier le rôle du métabolisme du céramide dans la dédifférenciation du mélanome induite par le TNF.

Tout d'abord, grâce à une analyse transcriptomique globale par RNA-Seq, nous avons montré que la dédifférenciation du mélanome induite par le TNF s'accompagne d'une reprogrammation du métabolisme des sphingolipides. Alors que les signatures transcriptomiques des voies de biosynthèse des sphingolipides et de glycosphingolipides corrèlent positivement avec nos signatures de dédifférenciation, les voies du catabolisme corrèlent négativement avec ce processus. Ces données ont été renforcées par une analyse des sphingolipides par spectrométrie de masse. En effet, le TNF entraine une accumulation de divers sphingolipides incluant les (dihydro)céramides, les (dihydro)sphingomyélines, les monohexosylcéramides (comme les glucosylcéramides) et les dihexosylcéramides (comme les lactosylcéramides).

Parmi les mécanismes impliqués dans ces altérations métaboliques, nous identifions pour la première fois que le TNF diminue l'expression et l'activité de la céramidase acide, enzyme centrale du catabolisme du céramide. La diminution de la céramidase acide par des stratégies de siARN suffit à déclencher un processus de dédifférenciation des cellules de mélanome. Nous retrouvons notamment la diminution du facteur de transcription MITF, régulateur clé de ce processus. De plus, la diminution de la céramidase acide mène à l'activation de la voie MAPK. De façon intéressante, l'inhibition de la voie des MAPK réverse la diminution d'une cible de MITF, Melan-a, induite par les siASAH-1. Ainsi, nous émettons l'hypothèse selon laquelle la céramidase acide pourrait réguler MITF *via* la voie des MAPK.

Nous observons également que le traitement des cellules de mélanome par le TNF et l'interférence ARN de la céramidase acide partage un programme transcriptomique commun. En effet, 28% des gènes modulés par le TNF sont aussi modulés par la diminution de la céramidase acide. Ces gènes sont impliqués dans des voies d'adhésion, d'interaction avec la matrice extracellulaire et la transition épithélio-mésenchymateuse, des processus fortement liés à la dédifférenciation du mélanome. De plus, grâce à l'inférence des facteurs de transcription à partir des données de RNA-Seq, nous identifions 6 facteurs de transcriptions activés de façon commune entre le TNF et le *siASAH1* (C/EBPβ, NFATC1, SMAD3, PPARα, IRF8, ZZZ3) et 2 facteurs de transcriptions dont l'activité diminuent (MITF et TCF7L2). L'activation de

C/EBPβ et SMAD3 et la diminution de l'activité de MITF sont signes de la mise en place d'un programme de dédifférenciation. De manière intéressante, la surexpression de la céramidase acide atténue la dédifférenciation du mélanome induit par le TNF. Ainsi, nous montrons que l'inhibition de la céramidase acide participe à la dédifférenciation induite par le TNF.

Les altérations du métabolisme du céramide sous l'effet du TNF dans les cellules de mélanome ne sont probablement pas limitées à l'inhibition de la céramidase acide. En effet, bloquer la synthèse globale des sphingolipides, par incubation des cellules de mélanome en présence de fumonisine B1 ou de myriocine, inhibe significativement la diminution de Melan-a induite par le TNF. A l'opposé, l'ajout de céramide ou de sphingosine exogène dans le milieu de culture aboutit à une diminution de Melan-a dans les cellules de mélanome. Ainsi, il semblerait que l'augmentation de la synthèse *de novo* des sphingolipides participe à la dédifférenciation induite par le TNF. Parallèlement, nous montrons que le TNF augmente l'expression d'*UGCG*, codant pour la glucosylcéramide synthase (GCS), ce qui se traduit dans nos données de spectrométrie de masse par une accumulation d'hexosylcéramides et dihexosylcéramides. L'inhibition de la GCS bloque la diminution de Melan-a induite par le TNF. L'accumulation de glycosphingolipides pourrait donc participer à la dédifférenciation du mélanome induite par le TNF. Le dosage des sphingolipides dans le plasma de patients atteints de mélanome avancé traités par anti-PD-1 et anti-CTLA-4, montre une accumulation de dihexosylcéramides chez les patients non répondeurs en comparaison aux patients répondeurs. Ainsi, les glycosphingolipides plasmatiques pourraient constituer des biomarqueurs prédictifs de la résistance aux immunothérapies chez des patients atteints de mélanome avancé.

Pour conclure, les altérations du métabolisme des céramides contribuent à la dédifférenciation des cellules de mélanome induite par le TNF et ouvre de nouvelles pistes pour le développement de stratégies thérapeutiques originales visant à réduire la progression du mélanome et la résistance aux immunothérapies.

DISCUSSION GÉNÉRALE

La moitié des patients atteints de mélanome avancé ne répondent pas ou résistent aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire. Notre équipe a mis en évidence que le TNF et des dérégulations du métabolisme du céramide sont impliqués dans la mise en place de ces résistances. De plus, une interconnexion existe entre le TNF et le métabolisme du céramide. Cependant, l'impact de cette interconnexion dans la mise en place des mécanismes de résistance n'est pas encore documenté. Ainsi, mon travail de thèse a mis en évidence que des changements du métabolisme du céramide contribuent à la dédifférenciation des cellules de mélanome induite par le TNF et pourraient participer à la résistance aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire.

La dédifférenciation du mélanome induit par le TNF est associée à une production de sphingolipides.

La dédifférenciation du mélanome est un processus similaire à la transition épithélio-mésenchymateuse, qui peut être induite par le TNF et participe à la résistance aux immunothérapies. Ceci est associé à la diminution de l'expression du facteur de transcription MITF et à la perte d'expression des antigènes mélanocytaires [113]. Diverses études démontrent qu'il existe un continuum d'états allant du plus différencié au moins différencié. Notamment, le travail de *Tsoi et al,* identifie 4 classes de mélanome (C1-C4), chacune caractérisée par un programme transcriptomique spécifique [78] Dans notre travail, afin d'évaluer la dédifférenciation induite par le TNF, nous avons établi un score permettant de quantifier les états différencié, transitoire et dédifférencié des cellules et des biopsies de mélanome à partir d'un ensemble de données de transcriptomique évaluées par RNA-Seq. Ce score est basé sur l'intégration de 4 signatures géniques précédemment publiées et décrivant différents états de prolifération et de différenciation (Hoek et al [74] ; Tsoi et al [78]; Andrews et al [237]). En effet, nous avons observé que, malgré une intersection faible de l'expression génique des différentes signatures de chaque étude, une analyse de corrélation sur des données publiques de patients atteints de mélanome traités par anti-PD-1 montre une très bonne corrélation de certaines de ces signatures entre elles. Ceci suggère l'existence de programmes biologiques communs résultants de profils d'expression génique différents, en accord avec une étude récente sur des lignées de mélanome dérivées de patients [237]. Ainsi, de par l'utilisation de ce nouveau score, nous avons observé que le TNF induit une dédifférenciation réversible associée à la production de divers sphingolipides dans la lignée primaire de mélanome différenciée WM35. De façon intéressante, certaines modulations du métabolisme semblent suivre la cinétique de dédifférenciation induite par le TNF. Ainsi, par une analyse d'enrichissement des voies impliquées dans le métabolisme du céramide de la base de donnée

GO, nous avons mis en évidence que la dédifférenciation induite par le TNF corrèle positivement avec une activation des voies de biosynthèse de céramide et de glycosylcéramide, et de catabolisme de la sphingomyéline. En accord avec cette analyse transcriptomique, le contenu en sphingolipide, quantifié par spectrométrie de masse, montre une accumulation d'hexosylcéramide, dihexosylcéramide et de plusieurs sous-espèces de céramide après 48h de traitement avec du TNF. L'accumulation de céramide et de glycosphingolipides par le TNF a déjà pu être mis en évidence dans différents cancers comme participant aux effets apoptotiques et inflammatoires du TNF [378,383,388]. De manière inattendue, nos résultats montrent une accumulation de sphingomyéline dans les WM35 traitées par du TNF, ce qui est contre-intuitif au vue des signatures géniques qui suggèrent une activation du catabolisme de la sphingomyéline mais aussi du rôle déjà décrit du TNF comme activateur des sphingomyélinases [376,396]. Cela pourrait s'expliquer par une augmentation de l'expression de *SGMS2* codant pour la sphingomyéline synthase 2 ainsi que des taux de céramide, substrat de cette enzyme. D'après nos analyses d'expression génique, l'accumulation de céramide dans les cellules de mélanome incubées en présence de TNF pourrait être due à une augmentation du catabolisme de la sphingomyéline mais également de la synthèse *de novo* de céramide. Il est à noter que nous n'observons pas de variation significative de l'expression de gènes codant pour des sphingomyélinases ou des enzymes impliquées dans la synthèse *de novo* du céramide, telles que les sérine palmitoylCoA transférases, les céramide synthases ou les dihydrocéramide désaturases. Ces observations doivent être interprétées avec prudence car nous ne pouvons pas exclure une augmentation des activités catalytiques de ces différentes enzymes, qui ne sont pas uniquement dépendentes du niveau d'expression génique mais qui impliquent aussi des modifications post-traductionnelles [415,416]. Par ailleurs, l'accumulation de céramide en réponse au TNF pourrait aussi résulter d'une baisse du catabolisme du céramide. En accord avec cette dernière hypothèse, nous avons montré, pour la première fois, que le TNF diminue l'expression et l'activité de la céramidase acide, une enzyme centrale du catabolisme du céramide, codée par *ASAH1*, ce qui pourrait contribuer à l'accumulation de céramide dans les cellules de mélanome en réponse au TNF.

La céramidase acide participe à la dédifférenciation induite par le TNF.

De manière intéressante, le profil d'expression d'*ASAH1* dans les cellules WM35 traitées par le TNF suit le profil d'expression des principaux marqueurs mélanocytaires et s'oppose à l'expression de marqueurs mésenchymateux. Ceci est en accord avec une précédente étude dans laquelle *ASAH1* a été identifié comme cible directe du facteur de transcription MITF,

qui joue un rôle crucial dans le changement phénotypique des cellules de mélanome [213] Ainsi, les cellules de mélanome ayant un phénotype dit prolifératif, correspondant à un état différencié, d'après notre propre classification, expriment fortement *MITF* et *ASAH1*. MITF étant un facteur de transcription activateur de l'expression du gène *ASAH1* [213], la diminution de l'expression de ce dernier par le TNF pourrait donc être la conséquence de la diminution de MITF. Parmi les facteurs de transcription que nous avons identifiés avec l'algorithme VIPER, CREB1 semble s'activer en réponse au TNF. Or, CREB1 a également été montré comme induisant l'expression d'*ASAH1* dans une lignée de cellules de la corticosurrénale [417]. Ainsi, nos résultats semblent montrer que l'activation de CREB1 n'est pas suffisante pour maintenir un niveau d'expression élevée d'*ASAH1* dans des cellules de mélanome exprimant un faible niveau de MITF.

Afin d'évaluer si la diminution de l'expression d'*ASAH1* dans les cellules de mélanome contribue à la dédifférenciation des cellules de mélanome en réponse au TNF, nous avons dans un premier temps transfecté les cellules WM35 avec des siARN ciblant le transcrit d'*ASAH1* et réalisé une étude transcriptomique par RNA-Seq. En analysant nos données en fonction des signatures de Tsoi et collaborateurs et de nos propres signatures, nous montrons que la diminution d'*ASAH1* induit, à elle seule, la mise en place d'un phénotype transitoire. Nous avons également observé que l'expression d'*ASAH1* diminue dans les tumeurs de patients classées comme transitoires ou dédifférenciées comparées aux tumeurs identifiées comme différenciées. Ainsi, la diminution de la céramidase acide induit la dédifférenciation des cellules de mélanome et pourrait ainsi contribuer à la dédifférenciation induite par le TNF. De manière intéressante, des études précédentes avaient décrit l'existence d'une boucle de régulation positive entre la céramidase acide et MITF [213,214]. En effet, il a été montré que l'inhibition et la surexpression de la céramidase acide respectivement réprime et stimule l'expression de MITF. Cependant, les mécanismes impliqués dans cette régulation ne sont pas clairement identifiés. De plus, une étude démontre que la surexpression de la sphingomyélinase acide entraine la dégradation protéasomale de MITF *via* l'activation de la voie MAPK [201]. Ceci pourrait dépendre de l'accumulation de céramide puisque l'incubation de mélanocytes humains en présence de céramide exogène s'accompagne d'une diminution de la synthèse de mélanine par activation soutenue des MAPK [238]. Dans notre étude, nous avons mis en évidence que la diminution de la céramidase acide active la voie des MAPK. De plus, l'inhibition de cette voie réverse la diminution de l'expression de le cible de MITF, Melan-a, induite par le siRNA *ASAH1*. Ainsi, nous émettons l'hypothèse selon laquelle, l'inhibition de la céramidase acide en

réponse au TNF conduit à la phosphorylation de MITF par les MAPK et à sa dégradation par le protéasome. Ce mécanisme post-traductionnel pourrait donc participer à la régulation négative de MITF consécutive à l'inhibition de la céramidase acide. Cela devra cependant être confirmé par western blot dans des cellules de mélanome incubées en présence, ou non, d'inhibiteurs du protéasome. MITF étant très finement régulé au niveau transcriptionnel et post-traductionnel, ce mécanisme n'est probablement pas le seul impliqué. L'inférence de l'activité des facteurs de transcription par VIPER sur nos données de RNA-Seq, montre qu'en supplément de la diminution attendue de l'activité de MITF, la céramidase acide régule d'autres facteurs de transcription pouvant être associés à la dédifférenciation et à la régulation de MITF. En particulier, la diminution de *ASAH1* entraine la diminution de l'activité du régulateur positif de MITF, LEF1, et inversement une augmentation de l'activité de TCF4. Or, un rôle déterminant du ratio TCF4/LEF1 existe dans le processus du switch phénotypique [418]. De plus, la diminution de la céramidase acide augmente également l'activité des facteurs de transcription TEAD1 et TEAD4, facteurs ayant également un rôle dans la mise en place du phénotype invasif [75]. Ainsi, l'implication de la céramidase acide dans le processus de dédifférenciation va au-delà de la simple régulation de MITF. Une analyse fonctionnelle de ces facteurs de transcription sera nécessaire afin de valider nos résultats et préciser les mécanismes impliqués dans la dédifférenciation des cellules de mélanome consécutivement à l'inhibition de la céramidase acide.

En ce qui concerne l'implication de la céramidase acide dans la dédifférenciation induite par le TNF, nous avons mis en évidence qu'environ 25% des gènes modulés par le TNF étaient également modulés par la diminution de la céramidase acide. Une analyse d'enrichissement de voies de signalisation montre que ce programme génique commun est impliqué dans des voies liées à l'adhésion, l'interaction avec la matrice extracellulaire et l'EMT, des signalisations fortement associées à la dédifférenciation des cellules de mélanome. La diminution de la céramidase acide module également des gènes de la signalisation du TNF *via* l'activation de NF-κB. Ainsi, la diminution de la céramidase acide lors de la dédifférenciation induite par le TNF pourrait participer à une boucle de maintien positif de ce phénotype. En comparant, les analyses d'inférence d'activité des facteurs de transcription entre les différents temps de TNF et la diminution de la céramidase acide, 6 facteurs de transcriptions (CEBPβ, NFATC1, SMAD3, PPARα, IRF8, ZZZ3) sont activés et 2 sont inactivés (MITF, TCF7L2) de façon commune. Parmi ces 8 facteurs de transcription, 3 sont directement liés à la dédifférenciation (CEBPβ, SMAD3, MITF). Grace à cette analyse nous confirmons la diminution de l'activité de

MITF, validant la boucle de régulation positive entre MITF et la céramidase acide. Nous montrons également une augmentation de l'activité de CEBPβ, facteur de transcription pouvant être activé par le TNF *via* la voie p38/MAPK [419]. De façon intéressante, une étude récente montre que ce facteur de transcription participe à la formation de métastases induites par l'activation de STAT3 dans un modèle murin de mélanome *via* la répression de MITF. En effet, une analyse d'ATAC-Seq identifie C/EBPβ comme un répresseur direct de MITF [420]. L'augmentation de NFATc1 (NFAT2) est également intéressante. Ce facteur participe à l'agressivité du mélanome [421]. De plus, il fait partie de la signalisation TGFβ, et est nécessaire à la transactivation de c-myc, un répresseur connu de MITF [422]. NFAT2 joue également un rôle dans l'équilibre entre prolifération et quiescence des cellules souches de la peau et a été montré comme inhibiteur des CDK4 [423]. Son augmentation en réponse au TNF et à la diminution de *ASAH1* est donc cohérente avec la mise en place d'un phénotype dédifférencié. Cela est également cohérent avec les phénomènes de sénescence et d'arrêt de cycle en G1/S observés lors de l'ablation totale d'ASAH1 [214]. Finalement, nous observons également une augmentation commune de l'activité de SMAD3. Or, la signalisation TGFβ/SMAD2/3 est cruciale dans la mise en place d'un phénotype invasif [424]. La diminution d'ASAH1 et le TNF partage donc un programme d'activation de facteurs de transcription commun impliqué dans la mise en place d'un phénotype invasif.

Afin d'aller au-delà de ces observations corrélatives, nous avons évalué l'impact du TNF sur une lignée de mélanome au phénotype transitoire, les A375, dans lesquelles nous avons surexprimé la céramidase acide. Dans un premier temps, comme attendu les cellules surexprimant la céramidase acide présentent un score différencié plus élevé que les cellules parentales. Contrairement à l'étude de Lai et *al*, où la restauration de l'expression d'*ASAH1* dans les A375 KO pour *ASAH1* entraine une augmentation de l'expression génique de MITF [214], nous n'avons pas observé d'augmentation significative de ce facteur dans nos conditions. Cela peut s'expliquer par le niveau basal d'expression d'*ASAH1*, qui même faible dans nos conditions n'est pas nul contrairement au modèle A375 KO. Toutefois, l'inférence des facteurs de transcription montre une augmentation significative de l'activité de MITF dans la lignée surexprimant la céramidase acide. Dans un second temps, nous avons mis en évidence que la surexpression de la céramidase acide atténue le processus de dédifférenciation induit par le TNF, sans toutefois le bloquer complétement. En effet, le TNF entraine une augmentation du score dédifférencié de la lignée surexprimant la céramidase acide, cependant ce score reste significativement inférieur au score de dédifférenciation des cellules parentales traitées au TNF.

Lorsqu'on s'intéresse à l'activité des facteurs de transcription augmentés communément entre le TNF et le siASAH1 identifiés précédemment, ces facteurs sont plus faiblement actifs dans la lignée qui surexprime la céramidase acide. A l'inverse, MITF est plus fortement actif. Ainsi, la surexpression de la céramidase acide inhibe partiellement la mise en place du programme invasif induit par le TNF. Cela se traduit au niveau protéique par une atténuation du marqueur invasif AXL. L'impact sur les facteurs de transcription identifiés devra être confirmé par westerm blot.

L'ensemble de nos résultats suggère que la reprogrammation du métabolisme du céramide est impliqué dans le maintien de la dédifférenciation induite par le TNF. Ainsi, le TNF stimule le processus de dédifférenciation, avec notamment la diminution de MITF, qui mène à la diminution de l'expression de la céramidase acide qui à son tour participe au programme de dédifférenciation. Une interconnexion similaire entre MITF et le métabolisme lipidique a déjà pu être mise en évidence. En effet, MITF régule le taux de saturation des acides gras *via* l'augmentation de l'expression de la stéaroyl-CoA désaturase (SCD), une enzyme permettant de produire des acides gras monoinsaturés [425]. Une faible activité de la SCD favorise la reprogrammation de la traduction, la signalisation inflammatoire et la réduction de l'expression de MITF, établissant ainsi une boucle de rétroaction positive pour stabiliser un état permettant une dissémination métastatique accrue. Ce mécanisme implique l'augmentation du facteur de transcription ATF4. Dans notre modèle, bien que nous observons une augmentation de l'activité d'ATF4 sous TNF, ce qui a déjà été documenté dans un contexte de dédifférenciation [92], la surexpression de la céramidase acide n'a pas d'effet sur ATF4 ; un traitement par siASAH1 entraine au contraire une diminution de l'activité de ce facteur. La régulation de MITF par la céramidase acide semble ainsi impliquer d'autres mécanismes. L'un des facteurs de transcription activé en commun entre le TNF et le siASAH1 est PPARα. La famille PPAR sont des senseurs des modulations du métabolisme. L'activation de PPARγ par le céramide est impliquée dans les mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire et d'apoptose. Ceci semble impliqué également la voie MAPK [426,427]. Ainsi, l'activation de ce facteur peut être l'un des mécanismes liant la diminution de la céramidase acide à la régulation de la dédifférenciation. Il a d'ailleurs récemment été montré que la diminution de la céramidase acide par shRNA, entraine suite à l'accumulation de céramide, l'activation de PPARγ et mène à la diminution des capacités prolifératives des cellules de mélanome [212]. En ce qui concerne PPARα, celui-ci joue un rôle important dans l'homéostasie lipidique de la peau, notamment dans le contrôle du métabolisme du cholestérol et du céramide [428]. De plus, les facteurs de la famille PPAR

fonctionnent comme des hétérodimères avec leur partenaire obligatoire RXR [429]. Or, un travail l'équipe du Dr JC Marine identifie le récepteur nucléaire RXR comme clé dans la mise en place d'un état transitoire impliqué dans les résistances aux thérapies ciblées [79]. Ainsi, l'activation de PPAR par des modulations du métabolisme du céramide pourrait activer un programme de dédifférenciation. En ce sens, le traitement des WM35 avec du céramide exogène induit une diminution de l'expression de Melan-a, suggérant un impact sur MITF qui doit être confirmé. Une étude par ChIPseq ou ChIP-PCR lors d'un traitement par siASAH1 permettrait de localiser ce facteur de transcription au niveau des promoteurs des gènes d'intérêt de la dédifférenciation.

Il est fort probable que ce ne soit pas la céramidase acide en elle-même, mais l'impact de sa diminution sur le métabolisme du céramide de façon globale qui participe à la dédifférenciation. Il serait intéressant de comparer les modulations du métabolisme induit par le TNF avec les modulations du métabolisme induit par la diminution de ASAH1. Pour ce faire, le dosage par spectrométrie de masse des sphingolipides traités par différents siASAH1 est en cours de réalisation. Nous nous attendons cependant à observer une accumulation de céramide et de glycosphingolipides. En effet, il a été montré que l'ablation totale de *ASAH1* dans les A375 entraine une augmentation de céramide et d'hexosylcéramide [214]. De plus, au niveau transcriptomique, nous observons dans nos données de RNA-Seq un enrichissement des voies de la bionsynthèse des sphingolipides et des glycopshingolipides. Afin de confirmer un rôle de la modulation globale du métabolisme dans les phénomènes de dédifférenciation nous avons bloqué la synthèse de céramide par la fumonisine B1 ou la myriocine. Ces deux inhibiteurs n'ont pas d'effet par eux même mais altèrent partiellement la diminution de Melan-a induite par le TNF suggérant un impact sur la dédifférenciation qui devra être confirmé. Ces agents sont cependant trop toxiques pour être envisagé comme stratégie thérapeutique dans le mélanome.

La glucosylcéramide synthase, une cible thérapeutique potentielle dans le mélanome

De façon intéressante, le TNF induit une augmentation de l'expression des transcrits de l'*UGCG*, codant la glucosylcéramide synthase (GCS). Cela se traduit par une accumulation d'hexosylcéramide (contenant majoritairement du glucosylcéramide) et de dihexosylcéramide (contenant majoritairement du lactosylcéramide). Il est connu que les glycosphingolipides participent à certains effets immunosuppresseurs du TNF. En effet la production induite par le TNF de GM1, GM2 et GD3 participe aux effets cytotoxiques du TNF sur les lymphocytes T

[386,387]. Dans notre étude, nous montrons que l'inhibition de la GCS, par l'utilisation de l'éliglustat, altère la diminution de Melan-a induite par le TNF. Une analyse globale par RNA-Seq permettra de confirmer l'impact de l'inhibition de la GCS sur la dédifférenciation induite par le TNF. Ainsi, l'inhibition de la GCS pourrait être bénéfique à la fois au niveau des cellules cancéreuses, en altérant leur dédifférenciation en réponse au TNF, mais également au niveau des lymphocytes T en réduisant les effets cytotoxiques du TNF. Par la suite, il sera également nécessaire de doser les gangliosides, plus en détails, par spectrométrie de masse afin de déterminer les espèces impliquées. Les gangliosides GM3 et GD3 sont associés à un mauvais pronostic pour les patients atteints de mélanome et à des capacités invasives des cellules tumorales augmentées [225,226]. De même, les GM2 et GD2 semblent favoriser l'angiogenèse et la motilité cellulaire [227]. Le GD2 est également décrit comme un marqueur des cellules souches cancéreuses facilitant la tumorigenèse [430]. De plus, le GD3 entraine l'activation des protéines p300Cas et Paxillin qui s'associent à FAK et Src, participant ainsi à la mise en place des point focaux d'adhésion et des structures de migration [229]. A noter, que la diminution de la céramidase acide participe également à la mise en place de la migration via l'activation de FAK [213].

Enfin, de par l'étude du contenu en sphingolipide du plasma de patients atteints de mélanome avancé traités par anti-PD-1 et anti-CTLA-4, nous observons une augmentation de dihexosylcéramide (vraisemblablement le lactosylcéramide) chez les non répondeurs. Ainsi, l'accumulation de dihexosylcéramide pourrait constituer un biomarqueur de résistance aux immunothérapies. De plus, bien que la dédifférenciation du mélanome n'est pas clairement été impliquée dans la mise en place de la résistance aux anti-PD-1, la diminution des populations différenciées suite au traitement s'accompagne de l'émergence d'une population résistante [237]. Ainsi, la reprogrammation du métabolisme du céramide par le TNF, avec notamment l'accumulation de glycosphingolipides, participant à la fois à la dédifférenciation des cellules tumorales et à la mort des lymphocytes T, pourrait être un des mécanismes de résistance aux ICI dépendants du TNF. Ainsi, il serait intéressant de doser le contenu sphingolipidique du plasma de nos cohortes de patients traités avec une combinaison d'anti-PD-1, d'anti-CTLA-4 et d'anti-TNF afin de déterminer une signature dépendante du TNF et impliquée dans la résistance. Il serait également intéressant d'évaluer dans un modèle murin l'efficacité de l'éliglustat en combinaison avec les ICI et d'étudier dans ce modèle l'état de dédifférenciation des tumeurs avant et après traitements. Il est à noter que les travaux du groupe de Ladish ont

montré une diminution de la tumorigenèse de cellules de mélanome MEB4 (dérivées de la lignée B16) chez la souris par inhibition pharmacologique de la GCS [217].

Pour conclure, la dédifférenciation du mélanome induite par le TNF est associée à une reprogrammation du métabolisme du céramide. Cette reprogrammation participe certainement à l'adaptation énergétique nécessaire à maintenir un phénotype invasif. Le blocage de la synthèse des sphingolipides et notamment de la glucosylcéramide synthase altère la dédifférenciation induite par le TNF. De plus, une accumulation de dihexosylcéramide est observé dans le plasma des patients non-répondeurs aux immunothérapies. Ainsi l'inhibition de la GCS en combinaison avec les ICI pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique dans la prise en charge des patients atteints de mélanome métastatique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Caini, S. *et al.* (2009) Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma according to anatomical site and clinico-pathological variant. *Eur J Cancer* 45, 3054–3063
2. Leiter, U. *et al.* (2020) Epidemiology of Skin Cancer: Update 2019. *Adv Exp Med Biol* 1268, 123–139
3. Gandini, S. *et al.* (2005) Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer* 41, 28–44
4. Gandini, S. *et al.* (2005) Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer* 41, 2040–2059
5. Ford, D. *et al.* (1995) Risk of cutaneous melanoma associated with a family history of the disease. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). *Int J Cancer* 62, 377–381
6. van der Leest, R.J.T. *et al.* (2015) Risk of subsequent cutaneous malignancy in patients with prior melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 29, 1053–1062
7. Debniak, T. (2004) Familial malignant melanoma - overview. *Hered Cancer Clin Pract* 2, 123–129
8. FitzGerald, M.G. *et al.* (1996) Prevalence of germ-line mutations in p16, p19ARF, and CDK4 in familial melanoma: analysis of a clinic-based population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8541–8545
9. Goldstein, A.M. *et al.* (2006) High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer Res* 66, 9818–9828
10. Zuo, L. *et al.* (1996) Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* 12, 97–99
11. Wiesner, T. *et al.* (2011) Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. *Nat Genet* 43, 1018–1021
12. Ward, K.A. *et al.* (2012) Germline melanoma susceptibility and prognostic genes: a review of the literature. *J Am Acad Dermatol* 67, 1055–1067
13. Raimondi, S. *et al.* (2008) MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. *Int J Cancer* 122, 2753–2760
14. Armstrong, B.K. and Kricker, A. (1993) How much melanoma is caused by sun exposure? *Melanoma Res* 3, 395–401
15. Gandini, S. *et al.* (2005) Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* 41, 45–60
16. Boniol, M. *et al.* (2012) Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 345, e4757
17. Hodis, E. *et al.* (2012) A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 150, 251–263
18. Zaidi, M.R. *et al.* (2008) From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *J Invest Dermatol* 128, 2381–2391
19. Martín-Gorgojo, A. and Nagore, E. (2018) Melanoma Arising in a Melanocytic Nevus. *Actas Dermosifiliogr (Engl Ed)* 109, 123–132
20. Hayward, N.K. *et al.* (2017) Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature* 545, 175–180
21. Cancer Genome Atlas Network (2015) Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* 161, 1681–1696
22. Pollock, P.M. *et al.* (2003) High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 33, 19–20
23. Patton, E.E. *et al.* (2005) BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol* 15, 249–254

24. Yang, H. *et al.* (2017) Activated MEK cooperates with Cdkn2a and Pten loss to promote the development and maintenance of melanoma. *Oncogene* 36, 3842–3851
25. Palmieri, G. *et al.* (2018) Molecular Pathways in Melanomagenesis: What We Learned from Next-Generation Sequencing Approaches. *Curr Oncol Rep* 20, 86
26. Omholt, K. *et al.* (2003) NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res* 9, 6483–6488
27. Nissan, M.H. *et al.* (2014) Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer Res* 74, 2340–2350
28. Ranzani, M. *et al.* (2015) BRAF/NRAS wild-type melanoma, NF1 status and sensitivity to trametinib. *Pigment Cell Melanoma Res* 28, 117–119
29. Horn, S. *et al.* (2013) TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* 339, 959–961
30. Shain, A.H. *et al.* (2015) The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N Engl J Med* 373, 1926–1936
31. Bai, X. *et al.* (2017) MAPK Pathway and TERT Promoter Gene Mutation Pattern and Its Prognostic Value in Melanoma Patients: A Retrospective Study of 2,793 Cases. *Clin Cancer Res* 23, 6120–6127
32. Sharpless, E. and Chin, L. (2003) The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene* 22, 3092–3098
33. Wu, H. *et al.* (2003) PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* 22, 3113–3122
34. Zuo, Q. *et al.* (2018) AXL/AKT axis mediated-resistance to BRAF inhibitor depends on PTEN status in melanoma. *Oncogene* 37, 3275–3289
35. Viros, A. *et al.* (2014) Ultraviolet radiation accelerates BRAF-driven melanomagenesis by targeting TP53. *Nature* 511, 478–482
36. Krayem, M. *et al.* (2016) p53 Reactivation by PRIMA-1(Met) (APR-246) sensitises (V600E/K)BRAF melanoma to vemurafenib. *Eur J Cancer* 55, 98–110
37. Gembarska, A. *et al.* (2012) MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nat Med* 18, 1239–1247
38. Schadendorf, D. *et al.* (2015) Melanoma. *Nat Rev Dis Primers* 1, 15003
39. Brady, M.S. *et al.* (2000) Patterns of detection in patients with cutaneous melanoma. *Cancer* 89, 342–347
40. Robinson, J.K. and Turrisi, R. (2006) Skills training to learn discrimination of ABCDE criteria by those at risk of developing melanoma. *Arch Dermatol* 142, 447–452
41. Vestergaard, M.E. *et al.* (2008) Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: a meta-analysis of studies performed in a clinical setting. *Br J Dermatol* 159, 669–676
42. Carli, P. *et al.* (2004) Improvement of malignant/benign ratio in excised melanocytic lesions in the "dermoscopy era": a retrospective study 1997-2001. *Br J Dermatol* 150, 687–692
43. Salerni, G. *et al.* (2012) Benefits of total body photography and digital dermatoscopy ("two-step method of digital follow-up") in the early diagnosis of melanoma in patients at high risk for melanoma. *J Am Acad Dermatol* 67, e17-27
44. Lodha, S. *et al.* (2008) Discordance in the histopathologic diagnosis of difficult melanocytic neoplasms in the clinical setting. *J Cutan Pathol* 35, 349–352
45. Ohsie, S.J. *et al.* (2008) Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol* 35, 433–444
46. Pellacani, G. *et al.* (2014) Reflectance confocal microscopy as a second-level examination in skin oncology improves diagnostic accuracy and saves unnecessary excisions: a longitudinal prospective study. *Br J Dermatol* 171, 1044–1051

47. Mélanome cutané - Prise en charge | Recommandations | VIDAL Campus[Online]. Available: https://campus.vidal.fr/recommandations/4043/melanome_cutane/prise_en_charge/. [Accessed: 30-Oct-2022]
48. Ives, N.J. *et al.* (2017) Adjuvant interferon-α for the treatment of high-risk melanoma: An individual patient data meta-analysis. *Eur J Cancer* 82, 171–183
49. Yang, H. *et al.* (2010) RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models. *Cancer Res* 70, 5518–5527
50. King, A.J. *et al.* (2013) Dabrafenib; preclinical characterization, increased efficacy when combined with trametinib, while BRAF/MEK tool combination reduced skin lesions. *PLoS One* 8, e67583
51. Koelblinger, P. *et al.* (2018) Development of encorafenib for BRAF-mutated advanced melanoma. *Curr Opin Oncol* 30, 125–133
52. McArthur, G.A. *et al.* (2014) Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol* 15, 323–332
53. Robert, C. *et al.* (2015) Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med* 372, 30–39
54. Dummer, R. *et al.* (2018) Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 19, 603–615
55. Long, G.V. *et al.* (2015) Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 386, 444–451
56. Long, G.V. *et al.* (2017) Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med* 377, 1813–1823
57. Tangella, L.P. *et al.* (2021) Resistance mechanisms to targeted therapy in BRAF-mutant melanoma - A mini review. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1865, 129736
58. Catalanotti, F. *et al.* (2017) PTEN Loss-of-Function Alterations Are Associated With Intrinsic Resistance to BRAF Inhibitors in Metastatic Melanoma. *JCO Precis Oncol* 1, PO.16.00054
59. Watson, I.R. *et al.* (2014) The RAC1 P29S hotspot mutation in melanoma confers resistance to pharmacological inhibition of RAF. *Cancer Res* 74, 4845–4852
60. Smalley, K.S.M. *et al.* (2008) Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Mol Cancer Ther* 7, 2876–2883
61. Long, G.V. *et al.* (2014) Increased MAPK reactivation in early resistance to dabrafenib/trametinib combination therapy of BRAF-mutant metastatic melanoma. *Nat Commun* 5, 5694
62. Irvine, M. *et al.* (2018) Oncogenic PI3K/AKT promotes the step-wise evolution of combination BRAF/MEK inhibitor resistance in melanoma. *Oncogenesis* 7, 72
63. Lee, N. *et al.* (2016) Tumour-infiltrating lymphocytes in melanoma prognosis and cancer immunotherapy. *Pathology* 48, 177–187
64. Lennerz, V. *et al.* (2005) The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16013–16018
65. Kirkwood, J.M. *et al.* (2001) High-dose interferon alfa-2b significantly prolongs relapse-free and overall survival compared with the GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIB-III melanoma: results of intergroup trial E1694/S9512/C509801. *J Clin Oncol* 19, 2370–2380
66. Atkins, M.B. *et al.* (2000) High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. *Cancer J Sci Am* 6 Suppl 1, S11-14

67. Schwartzentruber, D.J. *et al.* (2011) gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N Engl J Med* 364, 2119–2127
68. Leach, D.R. *et al.* (1996) Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271, 1734–1736
69. Iwai, Y. *et al.* (2002) Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12293–12297
70. Larkin, J. *et al.* (2019) Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 381, 1535–1546
71. Weber, J. *et al.* (2017) Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *N Engl J Med* 377, 1824–1835
72. Goding, C.R. (2000) Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev* 14, 1712–1728
73. Carreira, S. *et al.* (2006) Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev* 20, 3426–3439
74. Hoek, K.S. *et al.* (2006) Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res* 19, 290–302
75. Verfaillie, A. *et al.* (2015) Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat Commun* 6, 6683
76. Widmer, D.S. *et al.* (2012) Systematic classification of melanoma cells by phenotype-specific gene expression mapping. *Pigment Cell Melanoma Res* 25, 343–353
77. Hoek, K.S. *et al.* (2008) In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res* 68, 650–656
78. Tsoi, J. *et al.* (2018) Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. *Cancer Cell* 33, 890-904.e5
79. Rambow, F. *et al.* (2018) Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. *Cell* 174, 843-855.e19
80. Tirosh, I. *et al.* (2016) Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* 352, 189–196
81. Khoja, L. *et al.* (2014) Prevalence and heterogeneity of circulating tumour cells in metastatic cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 24, 40–46
82. Chapman, A. *et al.* (2014) Heterogeneous tumor subpopulations cooperate to drive invasion. *Cell Rep* 8, 688–695
83. Rowling, E.J. *et al.* (2020) Cooperative behaviour and phenotype plasticity evolve during melanoma progression. *Pigment Cell Melanoma Res* 33, 695–708
84. Arozarena, I. and Wellbrock, C. (2019) Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. *Nat Rev Cancer* 19, 377–391
85. Weeraratna, A.T. *et al.* (2002) Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 1, 279–288
86. Cheng, P.F. *et al.* (2015) Methylation-dependent SOX9 expression mediates invasion in human melanoma cells and is a negative prognostic factor in advanced melanoma. *Genome Biol* 16, 42
87. Restivo, G. *et al.* (2017) low neurotrophin receptor CD271 regulates phenotype switching in melanoma. *Nat Commun* 8, 1988
88. Caramel, J. *et al.* (2013) A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell* 24, 466–480
89. Vandamme, N. *et al.* (2020) The EMT Transcription Factor ZEB2 Promotes Proliferation of Primary and Metastatic Melanoma While Suppressing an Invasive, Mesenchymal-Like Phenotype. *Cancer Res* 80, 2983–2995

90. Richard, G. *et al.* (2016) ZEB1-mediated melanoma cell plasticity enhances resistance to MAPK inhibitors. *EMBO Mol Med* 8, 1143–1161
91. Restivo, G. *et al.* (2018) Publisher Correction: The low affinity neurotrophin receptor CD271 regulates phenotype switching in melanoma. *Nat Commun* 9, 314
92. Falletta, P. *et al.* (2017) Translation reprogramming is an evolutionarily conserved driver of phenotypic plasticity and therapeutic resistance in melanoma. *Genes Dev* 31, 18–33
93. Ferguson, J. *et al.* (2017) Glucose availability controls ATF4-mediated MITF suppression to drive melanoma cell growth. *Oncotarget* 8, 32946–32959
94. Smith, M.P. *et al.* (2014) The immune microenvironment confers resistance to MAPK pathway inhibitors through macrophage-derived TNFα. *Cancer Discov* 4, 1214–1229
95. Cheli, Y. *et al.* (2012) Hypoxia and MITF control metastatic behaviour in mouse and human melanoma cells. *Oncogene* 31, 2461–2470
96. Widmer, D.S. *et al.* (2013) Hypoxia contributes to melanoma heterogeneity by triggering HIF1α-dependent phenotype switching. *J Invest Dermatol* 133, 2436–2443
97. Feige, E. *et al.* (2011) Hypoxia-induced transcriptional repression of the melanoma-associated oncogene MITF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, E924-933
98. Fallahi-Sichani, M. *et al.* (2017) Adaptive resistance of melanoma cells to RAF inhibition via reversible induction of a slowly dividing de-differentiated state. *Mol Syst Biol* 13, 905
99. Shaffer, S.M. *et al.* (2017) Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature* 546, 431–435
100. Su, Y. *et al.* (2017) Single-cell analysis resolves the cell state transition and signaling dynamics associated with melanoma drug-induced resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 13679–13684
101. Rambow, F. *et al.* (2019) Melanoma plasticity and phenotypic diversity: therapeutic barriers and opportunities. *Genes Dev* 33, 1295–1318
102. Boshuizen, J. *et al.* (2020) Reversal of pre-existing NGFR-driven tumor and immune therapy resistance. *Nat Commun* 11, 3946
103. Müller, J. *et al.* (2014) Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun* 5, 5712
104. Nyakas, M. *et al.* (2022) AXL inhibition improves BRAF-targeted treatment in melanoma. *Sci Rep* 12, 5076
105. Nazarian, R. *et al.* (2010) Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 468, 973–977
106. Villanueva, J. *et al.* (2010) Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell* 18, 683–695
107. O'Connell, M.P. *et al.* (2013) Hypoxia induces phenotypic plasticity and therapy resistance in melanoma via the tyrosine kinase receptors ROR1 and ROR2. *Cancer Discov* 3, 1378–1393
108. Smith, M.P. *et al.* (2013) Effect of SMURF2 targeting on susceptibility to MEK inhibitors in melanoma. *J Natl Cancer Inst* 105, 33–46
109. Smith, M.P. *et al.* (2016) Inhibiting Drivers of Non-mutational Drug Tolerance Is a Salvage Strategy for Targeted Melanoma Therapy. *Cancer Cell* 29, 270–284
110. Obenauf, A.C. *et al.* (2015) Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. *Nature* 520, 368–372
111. Smith, M.P. *et al.* (2017) Targeting endothelin receptor signalling overcomes heterogeneity driven therapy failure. *EMBO Mol Med* 9, 1011–1029

112. Kawakami, Y. *et al.* (1995) Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J Immunol* 154, 3961–3968
113. Landsberg, J. *et al.* (2012) Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature* 490, 412–416
114. Mehta, A. *et al.* (2018) Immunotherapy Resistance by Inflammation-Induced Dedifferentiation. *Cancer Discov* 8, 935–943
115. Lee, J.H. *et al.* (2020) Transcriptional downregulation of MHC class I and melanoma de- differentiation in resistance to PD-1 inhibition. *Nat Commun* 11, 1897
116. Hugo, W. *et al.* (2016) Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell* 165, 35–44
117. Pérez-Guijarro, E. *et al.* (2020) Multimodel preclinical platform predicts clinical response of melanoma to immunotherapy. *Nat Med* 26, 781–791
118. Kim, Y.J. *et al.* (2021) Melanoma dedifferentiation induced by IFN-γ epigenetic remodeling in response to anti-PD-1 therapy. *J Clin Invest* 131, 145859
119. Riaz, N. *et al.* (2017) Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab. *Cell* 171, 934-949.e16
120. Futerman, A.H. and Hannun, Y.A. (2004) The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep* 5, 777–782
121. Hojjati, M.R. *et al.* (2005) Serine palmitoyl-CoA transferase (SPT) deficiency and sphingolipid levels in mice. *Biochim Biophys Acta* 1737, 44–51
122. Hornemann, T. *et al.* (2006) Cloning and initial characterization of a new subunit for mammalian serine-palmitoyltransferase. *J Biol Chem* 281, 37275–37281
123. Hornemann, T. *et al.* (2009) The SPTLC3 subunit of serine palmitoyltransferase generates short chain sphingoid bases. *J Biol Chem* 284, 26322–26330
124. Lone, M.A. *et al.* (2019) 1-Deoxysphingolipids. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1864, 512–521
125. Kihara, A. and Igarashi, Y. (2004) FVT-1 is a mammalian 3-ketodihydrosphingosine reductase with an active site that faces the cytosolic side of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 279, 49243–49250
126. Levy, M. and Futerman, A.H. (2010) Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life* 62, 347–356
127. Ternes, P. *et al.* (2002) Identification and characterization of a sphingolipid delta 4-desaturase family. *J Biol Chem* 277, 25512–25518
128. Mizutani, Y. *et al.* (2004) Identification of the human sphingolipid C4-hydroxylase, hDES2, and its up-regulation during keratinocyte differentiation. *FEBS Lett* 563, 93–97
129. Sandhoff, K. and Kolter, T. (1996) Topology of glycosphingolipid degradation. *Trends Cell Biol* 6, 98–103
130. Kolter, T. and Sandhoff, K. (2005) Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 81–103
131. Luzi, P. *et al.* (1995) Structure and organization of the human galactocerebrosidase (GALC) gene. *Genomics* 26, 407–409
132. Marchesini, N. and Hannun, Y.A. (2004) Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem Cell Biol* 82, 27–44
133. Chatelut, M. *et al.* (1998) Natural ceramide is unable to escape the lysosome, in contrast to a fluorescent analogue. *FEBS Lett* 426, 102–106
134. Tam, C. *et al.* (2010) Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *J Cell Biol* 189, 1027–1038

135. Gulbins, E. and Grassmé, H. (2002) Ceramide and cell death receptor clustering. *Biochim Biophys Acta* 1585, 139–145
136. Duan, R.-D. *et al.* (2003) Purification, localization, and expression of human intestinal alkaline sphingomyelinase. *J Lipid Res* 44, 1241–1250
137. Funato, K. and Riezman, H. (2001) Vesicular and nonvesicular transport of ceramide from ER to the Golgi apparatus in yeast. *J Cell Biol* 155, 949–959
138. Hanada, K. *et al.* (2003) Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 426, 803–809
139. Kumagai, K. *et al.* (2007) Interorganelle trafficking of ceramide is regulated by phosphorylation-dependent cooperativity between the PH and START domains of CERT. *J Biol Chem* 282, 17758–17766
140. Sugiura, M. *et al.* (2002) Ceramide kinase, a novel lipid kinase. Molecular cloning and functional characterization. *J Biol Chem* 277, 23294–23300
141. Simanshu, D.K. *et al.* (2013) Non-vesicular trafficking by a ceramide-1-phosphate transfer protein regulates eicosanoids. *Nature* 500, 463–467
142. Huitema, K. *et al.* (2004) Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J* 23, 33–44
143. Tani, M. and Kuge, O. (2009) Sphingomyelin synthase 2 is palmitoylated at the COOH-terminal tail, which is involved in its localization in plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 381, 328–332
144. Duran, J.M. *et al.* (2012) Sphingomyelin organization is required for vesicle biogenesis at the Golgi complex. *EMBO J* 31, 4535–4546
145. Ichikawa, S. *et al.* (1996) Expression cloning of a cDNA for human ceramide glucosyltransferase that catalyzes the first glycosylation step of glycosphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4638–4643
146. D'Angelo, G. *et al.* (2007) Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide. *Nature* 449, 62–67
147. Tokuda, N. *et al.* (2013) β4GalT6 is involved in the synthesis of lactosylceramide with less intensity than β4GalT5. *Glycobiology* 23, 1175–1183
148. Boot, R.G. *et al.* (2007) Identification of the non-lysosomal glucosylceramidase as beta-glucosidase 2. *J Biol Chem* 282, 1305–1312
149. Bosio, A. *et al.* (1996) Molecular cloning and characterization of the mouse CGT gene encoding UDP-galactose ceramide-galactosyltransferase (cerebroside synthetase). *Genomics* 35, 223–226
150. Honke, K. *et al.* (1997) Molecular cloning and expression of cDNA encoding human 3'-phosphoadenylylsulfate:galactosylceramide 3'-sulfotransferase. *J Biol Chem* 272, 4864–4868
151. Groux-Degroote, S. *et al.* (2017) Gangliosides: Structures, Biosynthesis, Analysis, and Roles in Cancer. *Chembiochem* 18, 1146–1154
152. Coant, N. *et al.* (2017) Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease. *Adv Biol Regul* 63, 122–131
153. Baker, D.L. *et al.* (2013) Structure and catalytic function of sphingosine kinases: analysis by site-directed mutagenesis and enzyme kinetics. *Biochim Biophys Acta* 1831, 139–146
154. Tani, M. *et al.* (2005) Involvement of neutral ceramidase in ceramide metabolism at the plasma membrane and in extracellular milieu. *J Biol Chem* 280, 36592–36600
155. Ikeda, M. *et al.* (2004) Sphingosine-1-phosphate lyase SPL is an endoplasmic reticulum-resident, integral membrane protein with the pyridoxal 5'-phosphate binding domain exposed to the cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* 325, 338–343

156. Pyne, S. *et al.* (2005) Lipid phosphate phosphatases and lipid phosphate signalling. *Biochem Soc Trans* 33, 1370–1374
157. H, L.S. *et al.* (2002) Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis. *The Journal of cell biology* 158
158. Mistry, P.K. *et al.* (2017) Gaucher disease: Progress and ongoing challenges. *Mol Genet Metab* 120, 8–21
159. Kong, W. *et al.* (2022) Update of treatment for Gaucher disease. *Eur J Pharmacol* 926, 175023
160. Astudillo, L. *et al.* (2015) Human genetic disorders of sphingolipid biosynthesis. *J Inherit Metab Dis* 38, 65–76
161. Siskind, L.J. and Colombini, M. (2000) The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. Implications for apoptosis. *J Biol Chem* 275, 38640–38644
162. Sitrin, R.G. *et al.* (2011) An obligate role for membrane-associated neutral sphingomyelinase activity in orienting chemotactic migration of human neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44, 205–212
163. Verderio, C. *et al.* (2018) Role of sphingolipids in the biogenesis and biological activity of extracellular vesicles. *J Lipid Res* 59, 1325–1340
164. Okazaki, T. *et al.* (1990) Role of ceramide as a lipid mediator of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cell differentiation. *J Biol Chem* 265, 15823–15831
165. Obeid, L.M. *et al.* (1993) Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 259, 1769–1771
166. Ji, L. *et al.* (1995) Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death by natural ceramide. *FEBS Lett* 358, 211–214
167. Tepper, C.G. *et al.* (1995) Role for ceramide as an endogenous mediator of Fas-induced cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8443–8447
168. Brugg, B. *et al.* (1996) Ceramide induces apoptosis in cultured mesencephalic neurons. *J Neurochem* 66, 733–739
169. Jarvis, W.D. *et al.* (1994) Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 73–77
170. Spinedi, A. *et al.* (1998) Ceramide-induced apoptosis is mediated by caspase activation independently from retinoblastoma protein post-translational modification. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 852–857
171. Tepper, A.D. *et al.* (1997) CD95/Fas-induced ceramide formation proceeds with slow kinetics and is not blocked by caspase-3/CPP32 inhibition. *J Biol Chem* 272, 24308–24312
172. Smyth, M.J. *et al.* (1996) prICE: a downstream target for ceramide-induced apoptosis and for the inhibitory action of Bcl-2. *Biochem J* 316 (Pt 1), 25–28
173. Ruvolo, P.P. *et al.* (1999) Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J Biol Chem* 274, 20296–20300
174. Nam, S.Y. *et al.* (2002) Low glucose-enhanced TRAIL cytotoxicity is mediated through the ceramide-Akt-FLIP pathway. *Oncogene* 21, 337–346
175. Yoon, G. *et al.* (2002) Ceramide increases Fas-mediated apoptosis in glioblastoma cells through FLIP down-regulation. *J Neurooncol* 60, 135–141
176. Salinas, M. *et al.* (2000) Inhibition of PKB/Akt1 by C2-ceramide involves activation of ceramide-activated protein phosphatase in PC12 cells. *Mol Cell Neurosci* 15, 156–169
177. Basu, S. *et al.* (1998) BAD enables ceramide to signal apoptosis via Ras and Raf-1. *J Biol Chem* 273, 30419–30426
178. Sumitomo, M. *et al.* (2002) Protein kinase Cdelta amplifies ceramide formation via mitochondrial signaling in prostate cancer cells. *J Clin Invest* 109, 827–836
179. Siskind, L.J. *et al.* (2006) Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion* 6, 118–125

180. Cremesti, A. *et al.* (2001) Ceramide enables fas to cap and kill. *J Biol Chem* 276, 23954–23961
181. Dbaibo, G.S. *et al.* (1995) Retinoblastoma gene product as a downstream target for a ceramide-dependent pathway of growth arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1347–1351
182. Rani, C.S. *et al.* (1995) Cell cycle arrest induced by an inhibitor of glucosylceramide synthase. Correlation with cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem* 270, 2859–2867
183. Alesse, E. *et al.* (1998) The growth arrest and downregulation of c-myc transcription induced by ceramide are related events dependent on p21 induction, Rb underphosphorylation and E2F sequestering. *Cell Death Differ* 5, 381–389
184. Kishikawa, K. *et al.* (1999) Phosphatidic acid is a potent and selective inhibitor of protein phosphatase 1 and an inhibitor of ceramide-mediated responses. *J Biol Chem* 274, 21335–21341
185. Lee, J.Y. *et al.* (2000) Regulation of cyclin-dependent kinase 2 activity by ceramide. *Exp Cell Res* 261, 303–311
186. Willaime, S. *et al.* (2001) Ceramide-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by an increase in p38 phosphorylation and not by the decrease in ERK phosphorylation. *Eur J Neurosci* 13, 2037–2046
187. Yang, J. and Duerksen-Hughes, P.J. (2001) Activation of a p53-independent, sphingolipid-mediated cytolytic pathway in p53-negative mouse fibroblast cells treated with N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. *J Biol Chem* 276, 27129–27135
188. López-Marure, R. *et al.* (2000) Ceramide mimics tumour necrosis factor-alpha in the induction of cell cycle arrest in endothelial cells. Induction of the tumour suppressor p53 with decrease in retinoblastoma/protein levels. *Eur J Biochem* 267, 4325–4333
189. Dbaibo, G.S. *et al.* (1998) p53-dependent ceramide response to genotoxic stress. *J Clin Invest* 102, 329–339
190. Fekry, B. *et al.* (2018) C16-ceramide is a natural regulatory ligand of p53 in cellular stress response. *Nat Commun* 9, 4149
191. Taniguchi, M. *et al.* (2012) Regulation of autophagy and its associated cell death by "sphingolipid rheostat": reciprocal role of ceramide and sphingosine 1-phosphate in the mammalian target of rapamycin pathway. *J Biol Chem* 287, 39898–39910
192. Scarlatti, F. *et al.* (2004) Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *J Biol Chem* 279, 18384–18391
193. Li, D.-D. *et al.* (2009) The pivotal role of c-Jun NH2-terminal kinase-mediated Beclin 1 expression during anticancer agents-induced autophagy in cancer cells. *Oncogene* 28, 886–898
194. Pattingre, S. *et al.* (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927–939
195. Pattingre, S. *et al.* (2009) Role of JNK1-dependent Bcl-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy. *J Biol Chem* 284, 2719–2728
196. Spassieva, S.D. *et al.* (2009) Disruption of ceramide synthesis by CerS2 down-regulation leads to autophagy and the unfolded protein response. *Biochem J* 424, 273–283
197. Sumantran, V.N. *et al.* (2015) Microarray analysis of differentially expressed genes regulating lipid metabolism during melanoma progression. *Indian J Biochem Biophys* 52, 125–131
198. Sorli, S.-C. *et al.* (2013) The nonlysosomal β-glucosidase GBA2 promotes endoplasmic reticulum stress and impairs tumorigenicity of human melanoma cells. *FASEB J* 27, 489–498
199. Belleri, M. *et al.* (2020) β-Galactosylceramidase Promotes Melanoma Growth via Modulation of Ceramide Metabolism. *Cancer Res* 80, 5011–5023

200. Montfort, A. *et al.* (2021) Neutral Sphingomyelinase 2 Heightens Anti-Melanoma Immune Responses and Anti-PD-1 Therapy Efficacy. *Cancer Immunol Res* 9, 568–582
201. Bizzozero, L. *et al.* (2014) Acid sphingomyelinase determines melanoma progression and metastatic behaviour via the microphtalmia-associated transcription factor signalling pathway. *Cell Death Differ* 21, 507–520
202. Bilal, F. *et al.* (2019) Sphingomyelin Synthase 1 (SMS1) Downregulation Is Associated With Sphingolipid Reprogramming and a Worse Prognosis in Melanoma. *Front Pharmacol* 10, 443
203. Realini, N. *et al.* (2016) Acid Ceramidase in Melanoma: EXPRESSION, LOCALIZATION, AND EFFECTS OF PHARMACOLOGICAL INHIBITION. *J Biol Chem* 291, 2422–2434
204. Albinet, V. *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
205. Carrié, L. *et al.* (2020) New Insights into the Role of Sphingolipid Metabolism in Melanoma. *Cells* 9
206. Bektas, M. *et al.* (2005) Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression. *Oncogene* 24, 178–187
207. Madhunapantula, S.V. *et al.* (2012) Targeting sphingosine kinase-1 to inhibit melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 25, 259–274
208. Mrad, M. *et al.* (2016) Downregulation of sphingosine kinase-1 induces protective tumor immunity by promoting M1 macrophage response in melanoma. *Oncotarget* 7, 71873–71886
209. Imbert, C. *et al.* (2020) Resistance of melanoma to immune checkpoint inhibitors is overcome by targeting the sphingosine kinase-1. *Nat Commun* 11, 437
210. Ishitsuka, A. *et al.* (2014) FTY720 and cisplatin synergistically induce the death of cisplatin-resistant melanoma cells through the downregulation of the PI3K pathway and the decrease in epidermal growth factor receptor expression. *Int J Mol Med* 34, 1169–1174
211. Han, W.S. *et al.* (2002) Effects of C2-ceramide on the Malme-3M melanoma cell line. *J Dermatol Sci* 30, 10–19
212. Malvi, P. *et al.* (2021) N-acylsphingosine amidohydrolase 1 promotes melanoma growth and metastasis by suppressing peroxisome biogenesis-induced ROS production. *Mol Metab* 48, 101217
213. Leclerc, J. *et al.* (2019) Lysosomal acid ceramidase ASAH1 controls the transition between invasive and proliferative phenotype in melanoma cells. *Oncogene* 38, 1282–1295
214. Lai, M. *et al.* (2017) Complete Acid Ceramidase ablation prevents cancer-initiating cell formation in melanoma cells. *Sci Rep* 7, 7411
215. Lai, M. *et al.* (2021) Ablation of Acid Ceramidase Impairs Autophagy and Mitochondria Activity in Melanoma Cells. *Int J Mol Sci* 22, 3247
216. Deng, W. *et al.* (2002) Transfection of glucosylceramide synthase antisense inhibits mouse melanoma formation. *Glycobiology* 12, 145–152
217. Weiss, M. *et al.* (2003) Inhibition of melanoma tumor growth by a novel inhibitor of glucosylceramide synthase. *Cancer Res* 63, 3654–3658
218. Yamaguchi, H. *et al.* (2003) Sphingosine-1-phosphate receptor subtype-specific positive and negative regulation of Rac and haematogenous metastasis of melanoma cells. *Biochem J* 374, 715–722
219. Arikawa, K. *et al.* (2003) Ligand-dependent inhibition of B16 melanoma cell migration and invasion via endogenous S1P2 G protein-coupled receptor. Requirement of inhibition of cellular RAC activity. *J Biol Chem* 278, 32841–32851

220. Desch, A. *et al.* (2012) Highly invasive melanoma cells activate the vascular endothelium via an MMP-2/integrin αvβ5-induced secretion of VEGF-A. *Am J Pathol* 181, 693–705
221. Liu, R. *et al.* (2020) C16:0 ceramide effect on melanoma malignant behavior and glycolysis depends on its intracellular or exogenous location. *Am J Transl Res* 12, 1123–1135
222. Carpinteiro, A. *et al.* (2015) Regulation of hematogenous tumor metastasis by acid sphingomyelinase. *EMBO Mol Med* 7, 714–734
223. Trajkovic, K. *et al.* (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319, 1244–1247
224. Hood, J.L. *et al.* (2011) Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res* 71, 3792–3801
225. Tringali, C. *et al.* (2014) Molecular subtyping of metastatic melanoma based on cell ganglioside metabolism profiles. *BMC Cancer* 14, 560
226. Ramos, R.I. *et al.* (2020) Upregulation of cell surface GD3 ganglioside phenotype is associated with human melanoma brain metastasis. *Mol Oncol* 14, 1760–1778
227. Yoshida, H. *et al.* (2020) B4GALNT1 induces angiogenesis, anchorage independence growth and motility, and promotes tumorigenesis in melanoma by induction of ganglioside GM2/GD2. *Sci Rep* 10, 1199
228. Saha, S. and Mohanty, K.C. (2003) Enhancement of metastatic potential of mouse B16-melanoma cells to lung after treatment with gangliosides of B-16-melanoma cells of higher metastatic potential to lung. *Indian J Exp Biol* 41, 1253–1258
229. Hamamura, K. *et al.* (2005) Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11041–11046
230. Yesmin, F. *et al.* (2021) Ganglioside GD2 Enhances the Malignant Phenotypes of Melanoma Cells by Cooperating with Integrins. *Int J Mol Sci* 23, 423
231. Liu, J.-W. *et al.* (2009) De-N-acetyl GM3 promotes melanoma cell migration and invasion through urokinase plasminogen activator receptor signaling-dependent MMP-2 activation. *Cancer Res* 69, 8662–8669
232. Bedia, C. *et al.* (2011) Acid ceramidase expression modulates the sensitivity of A375 melanoma cells to dacarbazine. *J Biol Chem* 286, 28200–28209
233. Lai, M. *et al.* (2021) Acid ceramidase controls apoptosis and increases autophagy in human melanoma cells treated with doxorubicin. *Sci Rep* 11, 11221
234. Cervia, D. *et al.* (2016) Essential role for acid sphingomyelinase-inhibited autophagy in melanoma response to cisplatin. *Oncotarget* 7, 24995–25009
235. Ishitsuka, A. *et al.* (2014) FTY720 and cisplatin synergistically induce the death of cisplatin-resistant melanoma cells through the downregulation of the PI3K pathway and the decrease in epidermal growth factor receptor expression. *Int J Mol Med* 34, 1169–1174
236. Garandeau, D. *et al.* (2019) Targeting the Sphingosine 1-Phosphate Axis Exerts Potent Antitumor Activity in BRAFi-Resistant Melanomas. *Mol Cancer Ther* 18, 289–300
237. Andrews, M.C. *et al.* (2022) Multi-modal molecular programs regulate melanoma cell state. *Nat Commun* 13, 4000
238. Kim, D.-S. *et al.* (2002) Delayed ERK activation by ceramide reduces melanin synthesis in human melanocytes. *Cell Signal* 14, 779–785
239. Grivennikov, S.I. *et al.* (2005) Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by t cells and macrophages/neutrophils: protective and deleterious effects. *Immunity* 22, 93–104
240. Bashir, M.M. *et al.* (2009) TNF-alpha production in the skin. *Arch Dermatol Res* 301, 87–91

241. Warner, S.J. and Libby, P. (1989) Human vascular smooth muscle cells. Target for and source of tumor necrosis factor. *J Immunol* 142, 100–109
242. Sawada, M. *et al.* (1989) Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res* 491, 394–397
243. Köck, A. *et al.* (1990) Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J Exp Med* 172, 1609–1614
244. Spriggs, D. *et al.* (1987) Induction of tumor necrosis factor expression and resistance in a human breast tumor cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6563–6566
245. Idriss, H.T. and Naismith, J.H. (2000) TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 50, 184–195
246. Black, R.A. *et al.* (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385, 729–733
247. Tartaglia, L.A. *et al.* (1993) Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* 73, 213–216
248. Jiang, Y. *et al.* (1999) Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 283, 543–546
249. Hsu, H. *et al.* (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81, 495–504
250. Hsu, H. *et al.* (1996) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84, 299–308
251. Hsu, H. *et al.* (1996) TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4, 387–396
252. Shu, H.B. *et al.* (1996) The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13973–13978
253. Haas, T.L. *et al.* (2009) Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. *Mol Cell* 36, 831–844
254. Ea, C.-K. *et al.* (2006) Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell* 22, 245–257
255. Rahighi, S. *et al.* (2009) Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation. *Cell* 136, 1098–1109
256. Wang, C. *et al.* (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412, 346–351
257. Shim, J.-H. *et al.* (2005) TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev* 19, 2668–2681
258. Wang, L. *et al.* (2008) TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 133, 693–703
259. Du, C. *et al.* (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33–42
260. Oberst, A. *et al.* (2011) Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature* 471, 363–367
261. Li, J. *et al.* (2012) The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell* 150, 339–350
262. Wang, H. *et al.* (2014) Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Mol Cell* 54, 133–146
263. Irmler, M. *et al.* (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190–195

264. Wang, C.Y. *et al.* (1998) NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281, 1680–1683
265. Micheau, O. *et al.* (2001) NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* 21, 5299–5305
266. Micheau, O. and Tschopp, J. (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181–190
267. Verhagen, A.M. *et al.* (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43–53
268. Brenner, D. *et al.* (2015) Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol* 15, 362–374
269. Grell, M. *et al.* (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83, 793–802
270. Malinin, N.L. *et al.* (1997) MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385, 540–544
271. Pan, S. *et al.* (2002) Etk/Bmx as a tumor necrosis factor receptor type 2-specific kinase: role in endothelial cell migration and angiogenesis. *Mol Cell Biol* 22, 7512–7523
272. Tartaglia, L.A. *et al.* (1993) Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem* 268, 18542–18548
273. Rodríguez, M. *et al.* (2011) NF-kappaB signal triggering and termination by tumor necrosis factor receptor 2. *J Biol Chem* 286, 22814–22824
274. Fotin-Mleczek, M. *et al.* (2002) Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J Cell Sci* 115, 2757–2770
275. Degliantoni, G. *et al.* (1985) Natural killer (NK) cell-derived hematopoietic colony-inhibiting activity and NK cytotoxic factor. Relationship with tumor necrosis factor and synergism with immune interferon. *J Exp Med* 162, 1512–1530
276. Liu, C.C. *et al.* (1989) Identification and characterization of a membrane-bound cytotoxin of murine cytolytic lymphocytes that is related to tumor necrosis factor/cachectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3286–3290
277. Pasparakis, M. *et al.* (1996) Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 184, 1397–1411
278. Smith, C.A. *et al.* (1991) T2 open reading frame from the Shope fibroma virus encodes a soluble form of the TNF receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 176, 335–342
279. Bartee, E. *et al.* (2008) Tumor necrosis factor and interferon: cytokines in harmony. *Curr Opin Microbiol* 11, 378–383
280. Nakane, A. *et al.* (1988) Endogenous tumor necrosis factor (cachectin) is essential to host resistance against Listeria monocytogenes infection. *Infect Immun* 56, 2563–2569
281. Rothe, J. *et al.* (1993) Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by Listeria monocytogenes. *Nature* 364, 798–802
282. Pfeffer, K. *et al.* (1993) Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. *Cell* 73, 457–467
283. Peschon, J.J. *et al.* (1998) TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J Immunol* 160, 943–952
284. Jacobs, M. *et al.* (2007) Tumor necrosis factor is critical to control tuberculosis infection. *Microbes Infect* 9, 623–628

285. Steinshamn, S. *et al.* (1996) TNF receptors in murine Candida albicans infection: evidence for an important role of TNF receptor p55 in antifungal defense. *J Immunol* 157, 2155–2159
286. Marino, M.W. *et al.* (1997) Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8093–8098
287. Körner, H. *et al.* (2010) The role of TNF in parasitic diseases: still more questions than answers. *Int J Parasitol* 40, 879–888
288. Beutler, B. *et al.* (1985) Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 229, 869–871
289. Tracey, K.J. *et al.* (1987) Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 330, 662–664
290. Secher, T. *et al.* (2009) Crucial role of TNF receptors 1 and 2 in the control of polymicrobial sepsis. *J Immunol* 182, 7855–7864
291. Jang, D.-I. *et al.* (2021) The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-α) in Autoimmune Disease and Current TNF-α Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci* 22, 2719
292. Nagar, M. *et al.* (2010) TNF activates a NF-kappaB-regulated cellular program in human CD45RA- regulatory T cells that modulates their suppressive function. *J Immunol* 184, 3570–3581
293. Ahn, A. *et al.* (2021) Transcriptional Reprogramming and Constitutive PD-L1 Expression in Melanoma Are Associated with Dedifferentiation and Activation of Interferon and Tumour Necrosis Factor Signalling Pathways. *Cancers (Basel)* 13, 4250
294. Reinhardt, J. *et al.* (2017) MAPK Signaling and Inflammation Link Melanoma Phenotype Switching to Induction of CD73 during Immunotherapy. *Cancer Res* 77, 4697–4709
295. Montfort, A. *et al.* (2019) The TNF Paradox in Cancer Progression and Immunotherapy. *Front Immunol* 10, 1818
296. Carswell, E.A. *et al.* (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 3666–3670
297. Pennica, D. *et al.* (1984) Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312, 724–729
298. Selby, P. *et al.* (1987) Tumour necrosis factor in man: clinical and biological observations. *Br J Cancer* 56, 803–808
299. Creagan, E.T. *et al.* (1988) A phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer* 62, 2467–2471
300. Gérain, J. *et al.* (1992) High serum levels of TNF-alpha after its administration for isolation perfusion of the limb. *Cytokine* 4, 585–591
301. Lienard, D. *et al.* (1992) High-dose recombinant tumor necrosis factor alpha in combination with interferon gamma and melphalan in isolation perfusion of the limbs for melanoma and sarcoma. *J Clin Oncol* 10, 52–60
302. Manusama, E.R. *et al.* (1996) Isolated limb perfusion with TNF alpha and melphalan in a rat osteosarcoma model: a new anti-tumour approach. *Eur J Surg Oncol* 22, 152–157
303. Manusama, E.R. *et al.* (1996) Synergistic antitumour effect of recombinant human tumour necrosis factor alpha with melphalan in isolated limb perfusion in the rat. *Br J Surg* 83, 551–555
304. Nooijen, P.T. *et al.* (1996) Synergistic effects of TNF-alpha and melphalan in an isolated limb perfusion model of rat sarcoma: a histopathological, immunohistochemical and electron microscopical study. *Br J Cancer* 74, 1908–1915
305. Hoving, S. *et al.* (2006) Early destruction of tumor vasculature in tumor necrosis factor-alpha-based isolated limb perfusion is responsible for tumor response. *Anticancer Drugs* 17, 949–959

306. Swann, J.B. *et al.* (2008) Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 652–656
307. Ea, H. *et al.* (1988) The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF), I. Therapeutic action of TNF against an established murine sarcoma is indirect, immunologically dependent, and limited by severe toxicity. *The Journal of experimental medicine* 167
308. Ohue, Y. and Nishikawa, H. (2019) Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Sci* 110, 2080–2089
309. Valencia, X. *et al.* (2006) TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood* 108, 253–261
310. Kashii, Y. *et al.* (1999) Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J Immunol* 163, 5358–5366
311. Baxevanis, C.N. *et al.* (2000) Compromised anti-tumor responses in tumor necrosis factor-alpha knockout mice. *Eur J Immunol* 30, 1957–1966
312. Kearney, C.J. *et al.* (2018) Tumor immune evasion arises through loss of TNF sensitivity. *Sci Immunol* 3, eaar3451
313. Talmadge, J.E. *et al.* (1988) Immunomodulatory properties of recombinant murine and human tumor necrosis factor. *Cancer Res* 48, 544–550
314. Kratochvill, F. *et al.* (2015) TNF Counterbalances the Emergence of M2 Tumor Macrophages. *Cell Rep* 12, 1902–1914
315. Zhao, X. *et al.* (2007) Tumor necrosis factor receptor 2-mediated tumor suppression is nitric oxide dependent and involves angiostasis. *Cancer Res* 67, 4443–4450
316. Villeneuve, J. *et al.* (2005) Tumor necrosis factor reduces brain tumor growth by enhancing macrophage recruitment and microcyst formation. *Cancer Res* 65, 3928–3936
317. Probst, P. *et al.* (2019) Antibody-based Delivery of TNF to the Tumor Neovasculature Potentiates the Therapeutic Activity of a Peptide Anticancer Vaccine. *Clin Cancer Res* 25, 698–709
318. Elia, A.R. *et al.* (2018) Targeting Tumor Vasculature with TNF Leads Effector T Cells to the Tumor and Enhances Therapeutic Efficacy of Immune Checkpoint Blockers in Combination with Adoptive Cell Therapy. *Clin Cancer Res* 24, 2171–2181
319. Calcinotto, A. *et al.* (2012) Targeting TNF-α to neoangiogenic vessels enhances lymphocyte infiltration in tumors and increases the therapeutic potential of immunotherapy. *J Immunol* 188, 2687–2694
320. Cervera-Carrascon, V. *et al.* (2018) TNFa and IL-2 armed adenoviruses enable complete responses by anti-PD-1 checkpoint blockade. *Oncoimmunology* 7, e1412902
321. Freedman, M.H. *et al.* (1992) Central role of tumour necrosis factor, GM-CSF, and interleukin 1 in the pathogenesis of juvenile chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 80, 40–48
322. Beissert, S. *et al.* (1989) Regulation of tumor necrosis factor gene expression in colorectal adenocarcinoma: in vivo analysis by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5064–5068
323. Naylor, M.S. *et al.* (1993) Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. *J Clin Invest* 91, 2194–2206
324. Bozcuk, H. *et al.* (2004) Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6, and fasting serum insulin correlate with clinical outcome in metastatic breast cancer patients treated with chemotherapy. *Cytokine* 27, 58–65
325. Ferrajoli, A. *et al.* (2002) The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100, 1215–1219
326. Yoshida, N. *et al.* (2002) Interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and interleukin-1beta in patients with renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 86, 1396–1400

327. Karayiannakis, A.J. *et al.* (2001) Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and nutritional status in pancreatic cancer patients. *Anticancer Res* 21, 1355–1358
328. Orosz, P. *et al.* (1993) Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 177, 1391–1398
329. Moore, R.J. *et al.* (1999) Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med* 5, 828–831
330. Suganuma, M. *et al.* (1999) Essential role of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in tumor promotion as revealed by TNF-alpha-deficient mice. *Cancer Res* 59, 4516–4518
331. Kulbe, H. *et al.* (2007) The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res* 67, 585–592
332. Egberts, J.-H. *et al.* (2008) Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 68, 1443–1450
333. Stathopoulos, G.T. *et al.* (2007) Tumor necrosis factor-alpha promotes malignant pleural effusion. *Cancer Res* 67, 9825–9834
334. Zins, K. *et al.* (2007) Colon cancer cell-derived tumor necrosis factor-alpha mediates the tumor growth-promoting response in macrophages by up-regulating the colony-stimulating factor-1 pathway. *Cancer Res* 67, 1038–1045
335. Leibovich, S.J. *et al.* (1987) Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature* 329, 630–632
336. Fràter-Schröder, M. *et al.* (1987) Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5277–5281
337. Li, B. *et al.* (2009) Low levels of tumor necrosis factor alpha increase tumor growth by inducing an endothelial phenotype of monocytes recruited to the tumor site. *Cancer Res* 69, 338–348
338. Komori, A. *et al.* (1993) Tumor necrosis factor acts as a tumor promoter in BALB/3T3 cell transformation. *Cancer Res* 53, 1982–1985
339. Yan, B. *et al.* (2006) Tumor necrosis factor-alpha is a potent endogenous mutagen that promotes cellular transformation. *Cancer Res* 66, 11565–11570
340. Komori, J. *et al.* (2008) Activation-induced cytidine deaminase links bile duct inflammation to human cholangiocarcinoma. *Hepatology* 47, 888–896
341. Babbar, N. and Casero, R.A. (2006) Tumor necrosis factor-alpha increases reactive oxygen species by inducing spermine oxidase in human lung epithelial cells: a potential mechanism for inflammation-induced carcinogenesis. *Cancer Res* 66, 11125–11130
342. Thiery, J.P. (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442–454
343. Li, C.-W. *et al.* (2012) Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF-α requires NF-κB-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer Res* 72, 1290–1300
344. Ho, M.-Y. *et al.* (2012) TNF-α induces epithelial-mesenchymal transition of renal cell carcinoma cells via a GSK3β-dependent mechanism. *Mol Cancer Res* 10, 1109–1119
345. Shrestha, R. *et al.* (2020) TNF-α-mediated epithelial-to-mesenchymal transition regulates expression of immune checkpoint molecules in hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep* 21, 1849–1860
346. Riesenberg, S. *et al.* (2015) MITF and c-Jun antagonism interconnects melanoma dedifferentiation with pro-inflammatory cytokine responsiveness and myeloid cell recruitment. *Nat Commun* 6, 8755
347. Perotti, V. *et al.* (2016) NFATc2 is an intrinsic regulator of melanoma dedifferentiation. *Oncogene* 35, 2862–2872

348. Arnott, C.H. *et al.* (2004) Expression of both TNF-alpha receptor subtypes is essential for optimal skin tumour development. *Oncogene* 23, 1902–1910
349. Vredevoogd, D.W. *et al.* (2019) Augmenting Immunotherapy Impact by Lowering Tumor TNF Cytotoxicity Threshold. *Cell* 178, 585-599.e15
350. Pikarsky, E. *et al.* (2004) NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431, 461–466
351. Yu, L. *et al.* (2014) Tumor necrosis factor α induces epithelial-mesenchymal transition and promotes metastasis via NF-κB signaling pathway-mediated TWIST expression in hypopharyngeal cancer. *Oncol Rep* 31, 321–327
352. Liu, W. *et al.* (2020) TNF-α increases breast cancer stem-like cells through up-regulating TAZ expression via the non-canonical NF-κB pathway. *Sci Rep* 10, 1804
353. Lim, S.-O. *et al.* (2016) Deubiquitination and Stabilization of PD-L1 by CSN5. *Cancer Cell* 30, 925–939
354. Chen, X. *et al.* (2008) Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells. *J Immunol* 180, 6467–6471
355. Zaragoza, B. *et al.* (2016) Suppressive activity of human regulatory T cells is maintained in the presence of TNF. *Nat Med* 22, 16–17
356. Grinberg-Bleyer, Y. *et al.* (2010) Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs. *J Clin Invest* 120, 4558–4568
357. Chen, X. *et al.* (2007) Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* 179, 154–161
358. Zhao, X. *et al.* (2012) TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *J Clin Invest* 122, 4094–4104
359. Sade-Feldman, M. *et al.* (2013) Tumor necrosis factor-α blocks differentiation and enhances suppressive activity of immature myeloid cells during chronic inflammation. *Immunity* 38, 541–554
360. Hagemann, T. *et al.* (2006) Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. *J Immunol* 176, 5023–5032
361. Zheng, L. *et al.* (1995) Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377, 348–351
362. Ivagnès, A. *et al.* (2018) TNFR2/BIRC3-TRAF1 signaling pathway as a novel NK cell immune checkpoint in cancer. *Oncoimmunology* 7, e1386826
363. Bertrand, F. *et al.* (2015) Blocking Tumor Necrosis Factor α Enhances CD8 T-cell-Dependent Immunity in Experimental Melanoma. *Cancer Res* 75, 2619–2628
364. Popivanova, B.K. *et al.* (2008) Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest* 118, 560–570
365. Scott, K.A. *et al.* (2003) An anti-tumor necrosis factor-alpha antibody inhibits the development of experimental skin tumors. *Mol Cancer Ther* 2, 445–451
366. Madhusudan, S. *et al.* (2005) Study of etanercept, a tumor necrosis factor-alpha inhibitor, in recurrent ovarian cancer. *J Clin Oncol* 23, 5950–5959
367. Madhusudan, S. *et al.* (2004) A phase II study of etanercept (Enbrel), a tumor necrosis factor alpha inhibitor in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 10, 6528–6534
368. Brown, E.R. *et al.* (2008) A clinical study assessing the tolerability and biological effects of infliximab, a TNF-alpha inhibitor, in patients with advanced cancer. *Ann Oncol* 19, 1340–1346
369. Harrison, M.L. *et al.* (2007) Tumor necrosis factor alpha as a new target for renal cell carcinoma: two sequential phase II trials of infliximab at standard and high dose. *J Clin Oncol* 25, 4542–4549

370. Bertrand, F. *et al.* (2017) TNFα blockade overcomes resistance to anti-PD-1 in experimental melanoma. *Nat Commun* 8, 2256
371. Perez-Ruiz, E. *et al.* (2019) Prophylactic TNF blockade uncouples efficacy and toxicity in dual CTLA-4 and PD-1 immunotherapy. *Nature* 569, 428–432
372. Montfort, A. *et al.* (2021) Combining Nivolumab and Ipilimumab with Infliximab or Certolizumab in Patients with Advanced Melanoma: First Results of a Phase Ib Clinical Trial. *Clin Cancer Res* 27, 1037–1047
373. Yanaga, F. and Watson, S.P. (1992) Tumor necrosis factor alpha stimulates sphingomyelinase through the 55 kDa receptor in HL-60 cells. *FEBS Lett* 314, 297–300
374. Malagarie-Cazenave, S. *et al.* (2002) Sphingolipid signalling: molecular basis and role in TNF-alpha-induced cell death. *Expert Rev Mol Med* 4, 1–15
375. Lozano, J. *et al.* (2001) Cell autonomous apoptosis defects in acid sphingomyelinase knockout fibroblasts. *J Biol Chem* 276, 442–448
376. Ségui, B. *et al.* (2001) Involvement of FAN in TNF-induced apoptosis. *J Clin Invest* 108, 143–151
377. O'Brien, N.W. *et al.* (2003) Factor associated with neutral sphingomyelinase activation and its role in cardiac cell death. *Circ Res* 92, 589–591
378. Dbaibo, G.S. *et al.* (2001) Ceramide generation by two distinct pathways in tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *FEBS Lett* 503, 7–12
379. Hernández-Corbacho, M.J. *et al.* (2015) Tumor Necrosis Factor-α (TNFα)-induced Ceramide Generation via Ceramide Synthases Regulates Loss of Focal Adhesion Kinase (FAK) and Programmed Cell Death. *J Biol Chem* 290, 25356–25373
380. White-Gilbertson, S. *et al.* (2009) Ceramide synthase 6 modulates TRAIL sensitivity and nuclear translocation of active caspase-3 in colon cancer cells. *Oncogene* 28, 1132–1141
381. Chatterjee, S. *et al.* (1996) Studies of the action of ceramide-like substances (D- and L-PDMP) on sphingolipid glycosyltransferases and purified lactosylceramide synthase. *Glycoconj J* 13, 481–486
382. Martin, S.F. *et al.* (2006) Lactosylceramide is required in apoptosis induced by N-Smase. *Glycoconj J* 23, 147–157
383. Colell, A. *et al.* (2002) Ceramide generated by acidic sphingomyelinase contributes to tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis in human colon HT-29 cells through glycosphingolipids formation. Possible role of ganglioside GD3. *FEBS Lett* 526, 135–141
384. Dewald, J.H. *et al.* (2018) TNF differentially regulates ganglioside biosynthesis and expression in breast cancer cell lines. *PLoS One* 13, e0196369
385. Bobowski, M. *et al.* (2013) Estradiol represses the G(D3) synthase gene ST8SIA1 expression in human breast cancer cells by preventing NFκB binding to ST8SIA1 promoter. *PLoS One* 8, e62559
386. Das, T. *et al.* (2008) GM1 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in renal cell carcinoma, synergize to induce T-cell apoptosis. *Cancer Res* 68, 2014–2023
387. Sa, G. *et al.* (2009) GD3, an overexpressed tumor-derived ganglioside, mediates the apoptosis of activated but not resting T cells. *Cancer Res* 69, 3095–3104
388. Newcomb, B. *et al.* (2018) Identification of an acid sphingomyelinase ceramide kinase pathway in the regulation of the chemokine CCL5. *J Lipid Res* 59, 1219–1229
389. Al-Rashed, F. *et al.* (2021) Ceramide kinase regulates TNF-α-induced immune responses in human monocytic cells. *Sci Rep* 11, 8259
390. Alvarez, S.E. *et al.* (2010) Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature* 465, 1084–1088
391. Adada, M.M. *et al.* (2013) Sphingosine kinase 1 regulates tumor necrosis factor-mediated RANTES induction through p38 mitogen-activated protein kinase but independently of nuclear factor κB activation. *J Biol Chem* 288, 27667–27679

392. Pettus, B.J. *et al.* (2003) The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF-alpha. *FASEB J* 17, 1411–1421
393. Zeidan, Y.H. *et al.* (2006) Acid ceramidase but not acid sphingomyelinase is required for tumor necrosis factor-{alpha}-induced PGE2 production. *J Biol Chem* 281, 24695–24703
394. Terlizzi, M. *et al.* (2021) Sphingosine-1-Phosphate Contributes to TLR9-Induced TNF-α Release in Lung Tumor Cells. *Cell Physiol Biochem* 55, 222–234
395. Schioppa, T. *et al.* (2011) B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF-α during squamous carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 10662–10667
396. Schütze, S. *et al.* (1992) TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell* 71, 765–776
397. Ponnusamy, S. *et al.* (2010) Sphingolipids and cancer: ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance. *Future Oncol* 6, 1603–1624
398. Li, B. and Dewey, C.N. (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12, 323
399. Love, M.I. *et al.* (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550
400. Ycart, B. *et al.* (2014) Curbing false discovery rates in interpretation of genome-wide expression profiles. *J Biomed Inform* 47, 58–61
401. Tosolini, M. *et al.* (2016) Large-scale microarray profiling reveals four stages of immune escape in non-Hodgkin lymphomas. *Oncoimmunology* 5, e1188246
402. Harrell, F.E. (2021) Hmisc: Harrell Miscellaneous. R package
403. Gide, T.N. *et al.* (2019) Distinct Immune Cell Populations Define Response to Anti-PD-1 Monotherapy and Anti-PD-1/Anti-CTLA-4 Combined Therapy. *Cancer Cell* 35, 238-255.e6
404. Liu, D. *et al.* (2019) Integrative molecular and clinical modeling of clinical outcomes to PD1 blockade in patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 25, 1916–1927
405. Hänzelmann, S. *et al.* (2013) GSVA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* 14, 7
406. Garcia-Alonso, L. *et al.* (2019) Benchmark and integration of resources for the estimation of human transcription factor activities. *Genome Res* 29, 1363–1375
407. Alvarez, M.J. *et al.* (2016) Functional characterization of somatic mutations in cancer using network-based inference of protein activity. *Nat Genet* 48, 838–847
408. Leek, J.T. and Storey, J.D. (2007) Capturing Heterogeneity in Gene Expression Studies by Surrogate Variable Analysis. *PLOS Genetics* 3, e161
409. Lê, S. *et al.* (2008) FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software* 25, 1–18
410. Kassambara, A.M., F. (2020) factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7.
411. Wei, T.S., V. (2021) R package "corrplot": Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.92).
412. Wickham, H. (2016) ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.
413. Gu, Z. *et al.* (2016) Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 32, 2847–2849
414. Merrill, A.H. *et al.* (2005) Sphingolipidomics: High-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Methods* 36, 207–224
415. K, H. (2003) Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochimica et biophysica acta* 1632

416. Sassa, T. *et al.* (2016) Enzyme Activities of the Ceramide Synthases CERS2-6 Are Regulated by Phosphorylation in the C-terminal Region. *J Biol Chem* 291, 7477–7487
417. Lucki, N. and Sewer, M.B. (2009) The cAMP-responsive element binding protein (CREB) regulates the expression of acid ceramidase (ASAH1) in H295R human adrenocortical cells. *Biochim Biophys Acta* 1791, 706–713
418. Eichhoff, O.M. *et al.* (2011) Differential LEF1 and TCF4 expression is involved in melanoma cell phenotype switching. *Pigment Cell Melanoma Res* 24, 631–642
419. Zhang, G. *et al.* (2011) C/EBPβ mediates tumour-induced ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx upregulation and muscle wasting. *EMBO J* 30, 4323–4335
420. Swoboda, A. *et al.* (2021) STAT3 promotes melanoma metastasis by CEBP-induced repression of the MITF pathway. *Oncogene* 40, 1091–1105
421. Flockhart, R.J. *et al.* (2009) NFAT signalling is a novel target of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 101, 1448–1455
422. Singh, G. *et al.* (2010) Sequential activation of NFAT and c-Myc transcription factors mediates the TGF-beta switch from a suppressor to a promoter of cancer cell proliferation. *J Biol Chem* 285, 27241–27250
423. Baksh, S. *et al.* (2002) NFATc2-mediated repression of cyclin-dependent kinase 4 expression. *Mol Cell* 10, 1071–1081
424. Lüönd, F. *et al.* (2022) Hierarchy of TGFβ/SMAD, Hippo/YAP/TAZ, and Wnt/β-catenin signaling in melanoma phenotype switching. *Life Sci Alliance* 5, e202101010
425. Vivas-García, Y. *et al.* (2020) Lineage-Restricted Regulation of SCD and Fatty Acid Saturation by MITF Controls Melanoma Phenotypic Plasticity. *Mol Cell* 77, 120-137.e9
426. Wang, J. *et al.* (2006) Ceramide induces apoptosis via a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway. *Apoptosis* 11, 2043–2052
427. Wang, J. *et al.* (2007) Mechanisms involved in ceramide-induced cell cycle arrest in human hepatocarcinoma cells. *World J Gastroenterol* 13, 1129–1134
428. Rivier, M. *et al.* (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha enhances lipid metabolism in a skin equivalent model. *J Invest Dermatol* 114, 681–687
429. Michalik, L. *et al.* (2004) Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer* 4, 61–70
430. Battula, V.L. *et al.* (2012) Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest* 122, 2066–2078

LISTE DES PUBLICATIONS

Brevet: Inhibitors of the ceramide metabolic pathway for overcoming immunotherapy resistance in cancer.
Carine Dufau, Matthieu Genais, Anne Montfort, Thierry Levade, Nicolas Meyer, Nathalie Andrieu-Abadie, Bruno Ségui. % d'invention égal entre tous les inventeurs (14,28%)
Numéro de depot: EP22306318 Date: 6 Septembre 2022

New Insights into the Role of Sphingolipid Metabolism in Melanoma.
Carrié, L**.; Virazels, M**.; **Dufau, C**.;** Montfort, A.; Levade, T.; Ségui, B.; Andrieu-Abadie, N. *Cells* 2020, *9* (9).https://doi.org/10.3390/cells9091967.
** Co-premiers auteurs

Neutral sphingomyelinase 2 heightens anti-melanoma immune response and anti-PD-1 therapy efficacy.
Montfort A[#], Bertrand F[#], Rochotte J[#], Gilhodes J, Filleron T, Milhès J, **Dufau C**, Imbert C, Riond J, Tosolini M, Clarke CJ, Dufour F, Constantinescu AA, De Franca Junior N, Garcia V, Record M, Cordelier P, Brousset P, Rochaix P, Silvente-Poirot S, Therville N, ANDRIEU-ABADIE N., Levade T, Hannun YA, Benoist H, Meyer N, Micheau O, Colacios C[##], SEGUI B.[##,*]. Cancer Immunol Res. 2021 May;9(5):568-582. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-20-0342.
#co-first authors; ##co-senior authorships; *corresponding author

Combining Nivolumab and Ipilimumab with Infliximab or Certolizumab in Patients with Advanced Melanoma: First Results of a Phase Ib Clinical Trial.
Montfort, A.; Filleron, T.; Virazels, M.; **Dufau, C**.; Milhès, J.; Pagès, C.; Olivier, P.; Ayyoub, M.; Mounier, M.; Lusque, A.; Brayer, S.; Delord, J.-P.; Andrieu-Abadie, N.; Levade, T.; Colacios, C.; Ségui, B.; Meyer, N. *Clin. Cancer Res. Dec 3* 2020. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-3449.

Lipid Metabolic Reprogramming: Role in Melanoma Progression and Therapeutic Perspectives.
Pellerin, L.; Carrié, L.; **Dufau, C**.; Nieto, L.; Ségui, B.; Levade, T.; Riond, J.; Andrieu-Abadie, N. *Cancers* 2020, *12* (11). https://doi.org/10.3390/cancers12113147.

Anti-TNF, a Magic Bullet in Cancer Immunotherapy?
Montfort, A.; **Dufau, C**.; Colacios, C.; Andrieu-Abadie, N.; Levade, T.; Filleron, T.; Delord, J.-P.; Ayyoub, M.; Meyer, N.; Ségui, B. *J. Immunother. Cancer* 2019, *7* (1), 303. https://doi.org/10.1186/s40425-019-0802-y.

ANNEXES

Europäisches Patentamt | European Patent Office | Office européen des brevets

Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

Submission number	1000508306	
Application number	EP22306318.1	
File No. to be used for priority declarations	EP22306318	
Date of receipt	06 September 2022	
Your reference	SEGUI22410MC-AA	
Applicant	INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale)	
Country	FR	
Title	INHIBITORS OF THE CERAMIDE METABOLIC PATHWAY FOR OVERCOMING IMMUNOTHERAPY RESISTANCE IN CANCER	
Documents submitted	package-data.xml	ep-request.xml
	application-body.xml	ep-request.pdf (5 p.)
	SPECEPO-1.pdf\Text_22410EP.pdf (22 p.)	SPECEPO-2.pdf\Drawings_22410EP.pdf (5 p.)
Submitted by	CN=Matthieu Collin 43532	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	06 September 2022, 15:28:49 (CEST)	
Official Digest of Submission	CF:27:A1:8B:D7:22:08:AA:68:20:F7:50:27:2F:7F:08:A1:73:DF:D5	

/INPI, section dépôt/

InsermTransfert
Your partner in health innovation

Référence Dossier : BIO22410 – / MC

Pôle Propriété Industrielle
Secrétariat brevet : 01.55.03.01.07
Télécopie : 01.55.03.01.60
E-mail : propriete@inserm-transfert.fr -

FICHE PERSONNELLE « INVENTEUR »

(Les champs en jaune sont indispensables notamment pour la rémunération)

Je soussigné(e)
M (Mme) : DUFAU Carine Nationalité : Française

Adresse personnelle (*) "Maison Arzubia", 64640 LANTABAT

(*) Tout changement d'adresse personnelle ou professionnelle doit être indiqué dans les meilleurs délais
(**) Représente le pourcentage de participation à l'invention pour chaque inventeur, qui conditionne l'intéressement des inventeurs.

MA SITUATION A L'EPOQUE DE L'INVENTION			*MA SITUATION ACTUELLE*		
Organisme employeur mentionné sur la fiche de paie	Fonction exercée	Laboratoire / Equipe / mixité de l'Equipe /Adresse Téléphone / télécopie / E-mail (*)	Organisme employeur	Fonction exercée	Laboratoire / Equipe / mixité de l'Equipe /Adresse Téléphone / télécopie / E-mail (*)
Université Paul Sabatier UT III	Doctorante	Centre de Recherches en Cancérologie / Téléphone (ou) / UMR1037-CNRS 5071 / 2 avenue Hubert Curien Toulouse carine.dufau@gmail.com	UT III Université Paul Sabatier	Doctorante	CRCT / Eq 4 / UMR1037-CNRS 5071 2 avenue Hubert Curien 31000 Toulouse carine.dufau@gmail.com

Mon pourcentage de contribution à l'invention (**) : 16,2857 %

Déclare sur l'honneur, avoir pris connaissance du contenu de la demande de brevet 22 306 318.1 déposée la 06 Sept. 2022 intitulée : «INHIBITORS OF THE CERAMIDE METABOLIC PATHWAY FOR OVERCOMING IMMUNOTHERAPY RESISTANCE IN CANCER»
-J'atteste avoir participé aux travaux ayant donné lieu à la conception de l'invention décrite dans la demande de brevet identifiée ci-dessus.
-Je déclare qu'en application de la procédure en place à Inserm Transfert, j'ai pris connaissance, via un mémorandum intitulé « **Note sur le Statut d'Inventeur** », des critères juridiques de désignation des inventeurs et des conséquences d'une désignation incorrecte.
-Je confirme sur l'honneur que toutes les informations que j'ai fournies à Inserm Transfert au sujet de ma participation à l'invention sont exactes. J'atteste également que j'ai fourni ces informations en sachant que toute déclaration volontairement fausse ou trompeuse peut compromettre la validité de la demande de brevet ou de tout brevet qui en découlerait.
- J'atteste que j'ai réalisé l'invention dans l'une des circonstances suivantes :
  - dans l'exécution de mon contrat de travail, lequel comporte une mission inventive correspondant à mes fonctions effectives ;
  - dans l'exécution des études et recherches qui m'ont été explicitement confiées.
-J'accepte le classement dans la catégorie des inventions de mission.
-J'atteste avoir pris connaissance de la note intitulée « Note d'information sur la procédure » décrivant les actions qui seront entreprises par Inserm Transfert dans le cadre des procédures relatives au brevet, dans le cadre de l'évaluation de la technologie brevetée et dans sa promotion industrielle.

Fait à Toulouse **le** 17/10/2022 **«Lu et approuvé» (Signature)** Lu et approuvé

INHIBITORS OF THE CERAMIDE METABOLIC PATHWAY FOR OVERCOMING IMMUNOTHERAPY RESISTANCE IN CANCER

FIELD OF THE INVENTION:

The present invention is in the field of medicine, in particular oncology.

BACKGROUND OF THE INVENTION:

Advanced cutaneous melanoma can be treated by immunotherapy targeting immune check points such as PD-1 and CTL-A4. However, 50% of patients do no respond because of primary or acquired resistance mechanism. Thus, new targets for addressing the treatment of said resistance are highly needed.

SUMMARY OF THE INVENTION:

The present invention is defined by the claims. In particular, the present invention relates to use of inhibitors of the ceramide metabolic pathway for overcoming immunotherapy resistance in cancer.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION:

The present invention relates to a method of overcoming immunotherapy resistance in patient suffering from cancer thereof comprising administering to the patent a therapeutically effective amount of an agent that that reduces or prevents the increase in ceramide and glycosylated ceramide levels.

As used herein, the term "**cancer**" has its general meaning in the art and includes, but is not limited to, solid tumors and blood-borne tumors. The term cancer includes diseases of the skin, tissues, organs, bone, cartilage, blood and vessels. The term "**cancer**" further encompasses both primary and metastatic cancers. Examples of cancers that may be treated by methods and compositions of the invention include, but are not limited to, cancer cells from the bladder, blood, bone, bone marrow, brain, breast, colon, esophagus, gastrointestinal tract, gum, head, kidney, liver, lung, nasopharynx, neck, ovary, prostate, skin, stomach, testis, tongue, or uterus. In some embodiments, the subject suffers from a cancer selected from the group consisting of Acanthoma, Acinic cell carcinoma, Acoustic neuroma, Acral lentiginous melanoma, Acrospiroma, Acute eosinophilic leukemia, Acute lymphoblastic leukemia, Acute

megakaryoblastic leukemia, Acute monocytic leukemia, Acute myeloblastic leukemia with maturation, Acute myeloid dendritic cell leukemia, Acute myeloid leukemia, Acute promyelocytic leukemia, Adamantinoma, Adenocarcinoma, Adenoid cystic carcinoma, Adenoma, Adenomatoid odontogenic tumor, Adrenocortical carcinoma, Adult T-cell leukemia, Aggressive NK-cell leukemia, AIDS-Related Cancers, AIDS-related lymphoma, Alveolar soft part sarcoma, Ameloblastic fibroma, Anal cancer, Anaplastic large cell lymphoma, Anaplastic thyroid cancer, Angioimmunoblastic T-cell lymphoma, Angiomyolipoma, Angiosarcoma, Appendix cancer, Astrocytoma, Atypical teratoid rhabdoid tumor, Basal cell carcinoma, Basal-like carcinoma, B-cell leukemia, B-cell lymphoma, Bellini duct carcinoma, Biliary tract cancer, Bladder cancer, Blastoma, Bone Cancer, Bone tumor, Brain Stem Glioma, Brain Tumor, Breast Cancer, Brenner tumor, Bronchial Tumor, Bronchioloalveolar carcinoma, Brown tumor, Burkitt's lymphoma, Cancer of Unknown Primary Site, Carcinoid Tumor, Carcinoma, Carcinoma in situ, Carcinoma of the penis, Carcinoma of Unknown Primary Site, Carcinosarcoma, Castleman's Disease, Central Nervous System Embryonal Tumor, Cerebellar Astrocytoma, Cerebral Astrocytoma, Cervical Cancer, Cholangiocarcinoma, Chondroma, Chondrosarcoma, Chordoma, Choriocarcinoma, Choroid plexus papilloma, Chronic Lymphocytic Leukemia, Chronic monocytic leukemia, Chronic myelogenous leukemia, Chronic Myeloproliferative Disorder, Chronic neutrophilic leukemia, Clear-cell tumor, Colon Cancer, Colorectal cancer, Craniopharyngioma, Cutaneous T-cell lymphoma, Degos disease, Dermatofibrosarcoma protuberans, Dermoid cyst, Desmoplastic small round cell tumor, Diffuse large B cell lymphoma, Dysembryoplastic neuroepithelial tumor, Embryonal carcinoma, Endodermal sinus tumor, Endometrial cancer, Endometrial Uterine Cancer, Endometrioid tumor, Enteropathy-associated T-cell lymphoma, Ependymoblastoma, Ependymoma, Epithelioid sarcoma, Erythroleukemia, Esophageal cancer, Esthesioneuroblastoma, Ewing Family of Tumor, Ewing Family Sarcoma, Ewing's sarcoma, Extracranial Germ Cell Tumor, Extragonadal Germ Cell Tumor, Extrahepatic Bile Duct Cancer, Extramammary Paget's disease, Fallopian tube cancer, Fetus in fetu, Fibroma, Fibrosarcoma, Follicular lymphoma, Follicular thyroid cancer, Gallbladder Cancer, Gallbladder cancer, Ganglioglioma, Ganglioneuroma, Gastric Cancer, Gastric lymphoma, Gastrointestinal cancer, Gastrointestinal Carcinoid Tumor, Gastrointestinal Stromal Tumor, Gastrointestinal stromal tumor, Germ cell tumor, Germinoma, Gestational choriocarcinoma, Gestational Trophoblastic Tumor, Giant cell tumor of bone, Glioblastoma multiforme, Glioma, Gliomatosis cerebri, Glomus tumor, Glucagonoma, Gonadoblastoma, Granulosa cell tumor, Hairy Cell Leukemia, Hairy cell leukemia, Head and Neck Cancer, Head and neck cancer, Heart

cancer, Hemangioblastoma, Hemangiopericytoma, Hemangiosarcoma, Hematological malignancy, Hepatocellular carcinoma, Hepatosplenic T-cell lymphoma, Hereditary breast-ovarian cancer syndrome, Hodgkin Lymphoma, Hodgkin's lymphoma, Hypopharyngeal Cancer, Hypothalamic Glioma, Inflammatory breast cancer, Intraocular Melanoma, Islet cell carcinoma, Islet Cell Tumor, Juvenile myelomonocytic leukemia, Kaposi Sarcoma, Kaposi's sarcoma, Kidney Cancer, Klatskin tumor, Krukenberg tumor, Laryngeal Cancer, Laryngeal cancer, Lentigo maligna melanoma, Leukemia, Leukemia, Lip and Oral Cavity Cancer, Liposarcoma, Lung cancer, Luteoma, Lymphangioma, Lymphangiosarcoma, Lymphoepithelioma, Lymphoid leukemia, Lymphoma, Macroglobulinemia, Malignant Fibrous Histiocytoma, Malignant fibrous histiocytoma, Malignant Fibrous Histiocytoma of Bone, Malignant Glioma, Malignant, Mesothelioma, Malignant peripheral nerve sheath tumor, Malignant rhabdoid tumor, Malignant triton tumor, MALT lymphoma, Mantle cell lymphoma, Mast cell leukemia, Mediastinal germ cell tumor, Mediastinal tumor, Medullary thyroid cancer, Medulloblastoma, Medulloblastoma, Medulloepithelioma, Melanoma, Melanoma, Meningioma, Merkel Cell Carcinoma, Mesothelioma, Mesothelioma, Metastatic Squamous Neck Cancer with Occult Primary, Metastatic urothelial carcinoma, Mixed Mullerian tumor, Monocytic leukemia, Mouth Cancer, Mucinous tumor, Multiple Endocrine Neoplasia Syndrome, Multiple Myeloma, Multiple myeloma, Mycosis Fungoides, Mycosis fungoides, Myelodysplastic Disease, Myelodysplasia, Syndromes, Myeloid leukemia, Myeloid sarcoma, Myeloproliferative Disease, Myxoma, Nasal Cavity Cancer, Nasopharyngeal Cancer, Nasopharyngeal carcinoma, Neoplasm, Neurinoma, Neuroblastoma, Neuroblastoma, Neurofibroma, Neuroma, Nodular melanoma, Non-Hodgkin Lymphoma, Non-Hodgkin lymphoma, Nonmelanoma Skin Cancer, Non-Small Cell Lung Cancer, non-small cell lung cancer (NSCLC) which coexists with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), Ocular oncology, Oligoastrocytoma, Oligodendroglioma, Oncocytoma, Optic nerve sheath, meningioma, Oral Cancer, Oral cancer, Oropharyngeal Cancer, Osteosarcoma, Osteosarcoma, Ovarian Cancer, Ovarian cancer, Ovarian Epithelial Cancer, Ovarian Germ Cell Tumor, Ovarian Low Malignant Potential Tumor, Paget's disease of the breast, Pancoast tumor, Pancreatic Cancer, Pancreatic cancer, Papillary thyroid cancer, Papillomatosis, Paraganglioma, Paranasal Sinus Cancer, Parathyroid Cancer, Penile Cancer, Perivascular epithelioid cell tumor, Pharyngeal Cancer, Pheochromocytoma, Pineal Parenchymal Tumor of Intermediate Differentiation, Pineoblastoma, Pituicytoma, Pituitary adenoma, Pituitary tumor, Plasma Cell Neoplasm, Pleuropulmonary blastema, Polyembryoma, Precursor T-lymphoblastic lymphoma, Primary central nervous system lymphoma, Primary effusion lymphoma, Primary

Hepatocellular Cancer, Primary Liver Cancer, Primary peritoneal cancer, Primitive neuroectodermal tumor, Prostate cancer, Pseudomyxoma peritonei, Rectal Cancer, Renal cell carcinoma, Respiratory Tract Carcinoma Involving the NUT Gene on Chromosome 15, Retinoblastoma, Rhabdomyoma, Rhabdomyosarcoma, Richter's transformation, Sacrococcygeal teratoma, Salivary Gland Cancer, Sarcoma, Schwannomatosis, Sebaceous gland carcinoma, Secondary neoplasm, Seminoma, Serous tumor, Sertoli-Leydig cell tumor, Sex cord-stromal tumor, Sezary Syndrome, Signet ring cell carcinoma, Skin Cancer, Small blue round cell tumor, Small cell carcinoma, Small Cell Lung Cancer, Small cell lymphoma, Small intestine cancer, Soft tissue sarcoma, Somatostatinoma, Soot wart, Spinal Cord Tumor, Spinal tumor, Splenic marginal zone lymphoma, Squamous cell carcinoma, Stomach cancer, Superficial spreading melanoma, Supratentorial Primitive Neuroectodermal Tumor, Surface epithelial-stromal tumor, Synovial sarcoma, T-cell acute, lymphoblastic leukemia, T-cell large granular lymphocyte leukemia, T-cell leukemia, T-cell lymphoma, T-cell prolymphocytic leukemia, Teratoma, Terminal lymphatic cancer, Testicular cancer, Thecoma, Throat Cancer, Thymic Carcinoma, Thymoma, Thyroid cancer, Transitional Cell Cancer of Renal Pelvis and Ureter, Transitional cell carcinoma, Urachal cancer, Urethral cancer, Urogenital neoplasm, Uterine sarcoma, Uveal melanoma, Vaginal Cancer, Verner Morrison syndrome, Verrucous carcinoma, Visual Pathway Glioma, Vulvar Cancer, Waldenstrom's macroglobulinemia, Warthin's tumor, Wilms' tumor, or any combination thereof.

In some embodiments, the patient suffers from melanoma.

As used herein, the term "**melanoma**" refers to a condition characterized by the growth of a tumor arising from the melanocytic system of the skin and other organs. Most melanocytes occur in the skin, but are also found in the meninges, digestive tract, lymph nodes and eyes. When melanoma occurs in the skin, it is referred to as cutaneous melanoma. Melanoma can also occur in the eyes and is called ocular or intraocular melanoma. Melanoma occurs rarely in the meninges, the digestive tract, lymph nodes or other areas where melanocytes are found. In some embodiments, the melanoma is a metastatic melanoma. 40-60 % of melanomas carry an activating mutation in the gene encoding the serine-threonine protein kinase B-RAF (BRAF). Among the BRAF mutations observed in melanoma, over 90 % are at codon 600, and among these, over 90 % are a single nucleotide mutation resulting in substitution of valine for glutamic acid (BRAFV600E).

As used herein, the term "**treatment**" or "**treat**" refers to both prophylactic or preventive treatment as well as curative or disease modifying treatment, including treatment of patients at risk of contracting the disease or suspected to have contracted the disease as well as patients who are ill or have been diagnosed as suffering from a disease or medical condition, and includes suppression of clinical relapse. The treatment may be administered to a subject having a medical disorder or who ultimately may acquire the disorder, in order to prevent, cure, delay the onset of, reduce the severity of, or ameliorate one or more symptoms of a disorder or recurring disorder, or in order to prolong the survival of a subject beyond that expected in the absence of such treatment. By "**therapeutic regimen**" is meant the pattern of treatment of an illness, e.g., the pattern of dosing used during therapy. A therapeutic regimen may include an induction regimen and a maintenance regimen. The phrase "**induction regimen**" or "**induction period**" refers to a therapeutic regimen (or the portion of a therapeutic regimen) that is used for the initial treatment of a disease. The general goal of an induction regimen is to provide a high level of drug to a patient during the initial period of a treatment regimen. An induction regimen may employ (in part or in whole) a "**loading regimen**", which may include administering a greater dose of the drug than a physician would employ during a maintenance regimen, administering a drug more frequently than a physician would administer the drug during a maintenance regimen, or both. The phrase "**maintenance regimen**" or "**maintenance period**" refers to a therapeutic regimen (or the portion of a therapeutic regimen) that is used for the maintenance of a patient during treatment of an illness, e.g., to keep the patient in remission for long periods of time (months or years). A maintenance regimen may employ continuous therapy (e.g., administering a drug at a regular interval, e.g., weekly, monthly, yearly, etc.) or intermittent therapy (e.g., interrupted treatment, intermittent treatment, treatment at relapse, or treatment upon achievement of a particular predetermined criteria [e.g., disease manifestation, etc.]).

As used herein, the term "**immunotherapy**" has its general meaning in the art and refers to the treatment that consists in administering an immunogenic agent i.e. an agent capable of inducing, enhancing, suppressing or otherwise modifying an immune response.

In some embodiments, the immunotherapy consists in administering the patient with at least one immune checkpoint inhibitor.

As used herein, the term "**immune checkpoint inhibitor**" has its general meaning in the art and refers to any compound inhibiting the function of an immune inhibitory checkpoint protein.

As used herein the term "**immune checkpoint protein**" has its general meaning in the art and refers to a molecule that is expressed by T cells in that either turn up a signal (stimulatory checkpoint molecules) or turn down a signal (inhibitory checkpoint molecules). Immune checkpoint molecules are recognized in the art to constitute immune checkpoint pathways similar to the CTLA-4 and PD-1 dependent pathways (see e.g. Pardoll, 2012. Nature Rev Cancer 12:252-264; Mellman et al. , 2011. Nature 480:480- 489). Examples of inhibitory checkpoint molecules include A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, CD277, IDO, KIR, PD-1, LAG-3, TIM-3 and VISTA. Inhibition includes reduction of function and full blockade. Preferred immune checkpoint inhibitors are antibodies that specifically recognize immune checkpoint proteins. A number of immune checkpoint inhibitors are known and in analogy of these known immune checkpoint protein inhibitors, alternative immune checkpoint inhibitors may be developed in the (near) future. The immune checkpoint inhibitors include peptides, antibodies, nucleic acid molecules and small molecules. Examples of immune checkpoint inhibitor includes PD-1 antagonist, PD-L1 antagonist, PD-L2 antagonist CTLA-4 antagonist, VISTA antagonist, TIM-3 antagonist, LAG-3 antagonist, IDO antagonist, KIR2D antagonist, A2AR antagonist, B7-H3 antagonist, B7-H4 antagonist, and BTLA antagonist.

In some embodiments, PD-1 (Programmed Death-1) axis antagonists include PD-1 antagonist (for example anti-PD-1 antibody), PD-L1 (Programmed Death Ligand-1) antagonist (for example anti-PD-L1 antibody) and PD-L2 (Programmed Death Ligand-2) antagonist (for example anti-PD-L2 antibody). In some embodiments, the anti-PD-1 antibody is selected from the group consisting of MDX-1106 (also known as Nivolumab, MDX-1106-04, ONO-4538, BMS-936558, and Opdivo®), Merck 3475 (also known as Pembrolizumab, MK-3475, Lambrolizumab, Keytruda®, and SCH-900475), and CT-011 (also known as Pidilizumab, hBAT, and hBAT-1). In some embodiments, the PD-1 binding antagonist is AMP-224 (also known as B7-DCIg). In some embodiments, the anti-PD-L1 antibody is selected from the group consisting of YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105, and MEDI4736. MDX-1105, also known as BMS-936559, is an anti-PD-L1 antibody described in WO2007/005874. Antibody YW243.55. S70 is an anti-PD-L1 described in WO 2010/077634 A1. MEDI4736 is an anti-PD-L1 antibody described in WO2011/066389 and US2013/034559. MDX-1106, also known as MDX-1106-04, ONO-4538 or BMS-936558, is an anti-PD-1 antibody described in U.S. Pat.

No. 8,008,449 and WO2006/121168. Merck 3745, also known as MK-3475 or SCH-900475, is an anti-PD-1 antibody described in U.S. Pat. No. 8,345,509 and WO2009/114335. CT-011 (Pidizilumab), also known as hBAT or hBAT-1, is an anti-PD-1 antibody described in WO2009/101611. AMP-224, also known as B7-DCIg, is a PD-L2-Fc fusion soluble receptor described in WO2010/027827 and WO2011/066342. Atezolimumab is an anti-PD-L1 antibody described in U.S. Pat. No. 8,217,149. Avelumab is an anti-PD-L1 antibody described in US 20140341917. CA-170 is a PD-1 antagonist described in WO2015033301 & WO2015033299. Other anti-PD-1 antibodies are disclosed in U.S. Pat. No. 8,609,089, US 2010028330, and/or US 20120114649. In some embodiments, the PD-1 inhibitor is an anti-PD-1 antibody chosen from Nivolumab, Pembrolizumab or Pidilizumab. In some embodiments, PD-L1 antagonist is selected from the group comprising of Avelumab, BMS-936559, CA-170, Durvalumab, MCLA-145, SP142, STI-A1011, STIA1012, STI-A1010, STI-A1014, A110, KY1003 and Atezolimumab and the preferred one is Avelumab, Durvalumab or Atezolimumab.

In some embodiments, CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4) antagonists are selected from the group consisting of anti-CTLA-4 antibodies, human anti-CTLA-4 antibodies, mouse anti-CTLA-4 antibodies, mammalian anti-CTLA-4 antibodies, humanized anti-CTLA-4 antibodies, monoclonal anti-CTLA-4 antibodies, polyclonal anti-CTLA-4 antibodies, chimeric anti-CTLA-4 antibodies, MDX-010 (Ipilimumab), Tremelimumab, anti-CD28 antibodies, anti-CTLA-4 adnectins, anti-CTLA-4 domain antibodies, single chain anti-CTLA-4 fragments, heavy chain anti-CTLA-4 fragments, light chain anti-CTLA-4 fragments, inhibitors of CTLA-4 that agonize the co-stimulatory pathway, the antibodies disclosed in PCT Publication No. WO 2001/014424, the antibodies disclosed in PCT Publication No. WO 2004/035607, the antibodies disclosed in U.S. Publication No. 2005/0201994, and the antibodies disclosed in granted European Patent No. EP 1212422 B. Additional CTLA-4 antibodies are described in U.S. Pat. Nos. 5,811,097; 5,855,887; 6,051,227; and 6,984,720; in PCT Publication Nos. WO 01/14424 and WO 00/37504; and in U.S. Publication Nos. 2002/0039581 and 2002/086014. Other anti-CTLA-4 antibodies that can be used in a method of the present invention include, for example, those disclosed in: WO 98/42752; U.S. Pat. Nos. 6,682,736 and 6,207,156; Hurwitz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(17): 10067-10071 (1998); Camacho et al., J. Clin: Oncology, 22(145): Abstract No. 2505 (2004) (antibody CP-675206); Mokyr et al., Cancer Res., 58:5301-5304 (1998), and U.S. Pat. Nos. 5,977,318, 6,682,736, 7,109,003, and 7,132,281. A preferred clinical CTLA-4 antibody is human monoclonal antibody (also referred to as MDX-010 and Ipilimumab with CAS No. 477202-00-9 and available from Medarex, Inc.,

Bloomsbury, N.J.) is disclosed in WO 01/14424. With regard to CTLA-4 antagonist (antibodies), these are known and include Tremelimumab (CP-675,206) and Ipilimumab.

In some embodiments, the immunotherapy consists in administering to the patient a combination of a CTLA-4 antagonist and a PD-1 antagonist.

Other immune-checkpoint inhibitors include lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) inhibitors, such as IMP321, a soluble Ig fusion protein (Brignone et al., 2007, J. Immunol. 179:4202-4211). Other immune-checkpoint inhibitors include B7 inhibitors, such as B7-H3 and B7-H4 inhibitors. In particular, the anti-B7-H3 antibody MGA271 (Loo et al., 2012, Clin. Cancer Res. July 15 (18) 3834). Also included are TIM-3 (T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3) inhibitors (Fourcade et al., 2010, J. Exp. Med. 207:2175-86 and Sakuishi et al., 2010, J. Exp. Med. 207:2187-94). As used herein, the term "**TIM-3**" has its general meaning in the art and refers to T cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule 3. The natural ligand of TIM-3 is galectin 9 (Gal9). Accordingly, the term "**TIM-3 inhibitor**" as used herein refers to a compound, substance or composition that can inhibit the function of TIM-3. For example, the inhibitor can inhibit the expression or activity of TIM-3, modulate or block the TIM-3 signaling pathway and/or block the binding of TIM-3 to galectin-9. Antibodies having specificity for TIM-3 are well known in the art and typically those described in WO2011155607, WO2013006490 and WO2010117057.

As used herein, the term "**immunotherapy resistance**" refers to an acquired resistance of a cancer to the immune response induced by the immunotherapy. Therefore, a resistant tumor or tumor cell is more likely to escape and survive humoral and/or cellular immune defense mechanisms in a subject receiving the immunotherapy. The phrase "**overcoming immunotherapy resistance**" in context of the invention shall be effective if compared to a non-treated control, the tumor or tumor cell becomes more sensitive to an immune response induced by immunotherapy. In particular, the patient become a responder. As used herein the term "**responder**" in the context of the present disclosure refers to a patient that will achieve a response, i.e. a patient where the cancer is eradicated, reduced or improved after immunotherapy. According to the invention, the responders have an objective response and therefore the term does not encompass patients having a stabilized cancer such that the disease is not progressing after immunotherapy. A "**non-responder**" or "**refractory patient**" includes patients for whom the cancer does not show reduction or improvement after immunotherapy.

The term "**non responder**" also includes patients having a stabilized cancer. Typically, the characterization of the patient as a responder or non-responder can be performed by reference to a standard or a training set. The standard may be the profile of a patient who is known to be a responder or non-responder or alternatively may be a numerical value. Such predetermined standards may be provided in any suitable form, such as a printed list or diagram, computer software program, or other media. When it is concluded that the patient is a non-responder, the physician could take the decision to administer the agent that reduces or prevents the increase in ceramide levels. More particularly, the method of the present invention is particularly suitable for preventing tumor escape in a patient treated with immunotherapy. As used herein, the term "**tumor escape**" refers to any mechanism by which tumors escape the host's immune system.

In some embodiments, the immunotherapy resistance (or tumor escape) is induced by TNF-alpha. More particularly, the immunotherapy resistance results from the dedifferentiation of the tumor cells that is induced by TNF-alpha.

As used herein, the term "**dedifferentiation**" " refer to processes by which a tumor cell become less specialized in phenotype and broader in lineage potential.

As used herein, the term "**TNFα**" or "**TNF-alpha**" denotes the tumor necrosis factor - alpha. The human TNF-alpha is a human cytokine encoded by the TNF-alpha gene.

In some embodiments, the method of the present invention comprises administering to the patient a therapeutically effective combination of the agent that reduces or prevents the increase in ceramide levels with a TNFα blocking agent.

As used herein, the term "**TNFα blocking agent**" or "**TBA**", it is herein meant a biological agent which is capable of neutralizing the effects of TNFα. Said agent is a preferentially a protein such as a soluble TNFα receptor, e.g. Pegsunercept, or an antibody. In some embodiments, the TBA is a monoclonal antibody having specificity for TNFα or for TNFα receptor. In some embodiments, the TBA is selected in the group consisting of Etanercept (Enbrel®), Infliximab (Remicade®), Adalimumab (Humira®), Certolizumab pegol (Cimzia®), and golimumab (Simponi®). Recombinant TNF-receptor based proteins have also been developed (e.g. etanercept, a recombinant fusion protein consisting of two extracellular parts

of soluble TNFα receptor 2 (p75) joined by the Fc fragment of a human IgG1 molecule). A pegylated soluble TNF type 1 receptor can also be used as a TNF blocking agent. Additionally, thalidomide has been demonstrated to be a potent inhibitor of TNF production. TNFα blocking agents thus further include phosphodiesterase 4 (IV) inhibitor thalidomide analogues and other phosphodiesterase IV inhibitors. As used herein, the term "**etanercept**" or "**ETA**" denotes the tumor necrosis factor - alpha (TNFα) antagonist used for the treatment of rheumatoid arthritis. The term "etanercept" (ETA, ETN, Enbrel) is a recombinant TNF-receptor IgG-Fc-fusion protein composed of the p75 TNF receptor genetically fused to the Fc domain of IgG1. Etanercept neutralizes the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor-α (TNFα) and lymphotoxin-α (Batycka-Baran et al., 2012).

As used herein, the term "**ceramide**" has its general meaning in the art and refers to a sphingolipid signaling molecule generated from de novo synthesis which is coordinated by serine palmitosyltransferase (SPT) and ceramide synthase (CerS), and/or from enzymatic hydrolysis of sphingomyelin coordinated by sphingomyelinases (SMases). The steady-state availability of ceramide is also regulated by ceramidases that convert ceramide to sphingosine by catalyzing hydrolysis of the ceramide amide group. One form of acid ceramidase may also be a secreted enzyme, while a form of neutral ceramidase may be mitochondrial and hence might affect ceramide synthase-mediated ceramide signaling in the mitochondria. Ceramide is also generated by enzymatic hydrolysis of sphingomyelin by sphingomyelinases. Sphingomyelin is generated by the enzyme sphingomyelin synthase (SMS) and localizes to the outer leaflet of the plasma membrane, providing a semipermeable barrier to the extracellular environment. Several isoforms of sphingomyelinase can be distinguished by pH optima for their activity, and are referred to as acid (ASMase), neutral (NSMase) or alkaline SMase. Of these isoforms, NSMase and ASMase, may be activated rapidly by diverse stressors and cause increased ceramide levels within minutes to hours. Thus ceramide levels may be reduced by the administration of any agent or agents that directly or indirectly inhibit the synthesis of ceramide or ceramide metabolic enzymes. Agents that inhibit the enzymes of both the *de novo* and sphingomyelinase pathways are preferred.

As used herein, the term " **agent that that reduces or prevents the increase in ceramide and glycosylated ceramide levels**" refers to any naturally occurring or synthetically produced organic or inorganic element or composition that when administered to a subject results in a reduction of ceramide or glycosylated ceramide in the subject. A therapeutic reduction

expressed as a decrease in ceramide compared to levels in the absence of ceramide synthesis inhibitor, may be between 0.001 % to 10%, 10%-20%, 20%-30%, 30%-40%, 40%-50%, 50%-60%, 70%-80%, 80%-90%, or 90%-100%, preferably greater that 10% and most preferably greater then 50% of control values. Ceramide levels may be determined through any number of techniques known to those skilled in the art including but not limited to thin layer chromatography, high-pressure liquid chromatography, mass spectrometry, immunochemical based assays and enzyme based assays, including those using ceramide kinase or diacylglycerol kinase as described by *Bektas et al.* (*Analytical Biochemistry 320 (2003) 259-265*), and *Modrak* (*Methods in Molecular Medicine, vol. 111 :Vol 2: In Vivo Models, Imaging and Molecular Regulators., Ed. Blumenthal. Humana Press Inc., NJ*), and herby incorporated by reference.

The agents typically include any chemical compound, or bioactive molecule derived from any living organism, including agents derived from animal, plant, fungus or bacteria, including but not limited to amino acids, polypeptides, carbohydrates, oligonucleotides, or combinations thereof, which directly or indirectly inhibit ceramide synthesis, or the synthesis of ceramide metabolic enzymes. The most well-known examples are inhibitors which target the enzymes of the de novo synthesis and sphingomyelinase pathways. For review, see Delgado et al., (Delgado et al. (2006) Biochim Biophys Acta. 1758(12):1957-77) hereby incorporated by reference and discussed below. In some embodiments, the ceramide de novo pathway compromises a series of enzymes leading to ceramide from the starting components serine and palmitoyl CoA.

In some embodiments, the agent that inhibits ceramide synthesis is selected from the group consisting of serine palmitoyltransferase inhibitors, ceramide synthase inhibitors, dihydroceramide desaturase inhibitors, sphingomyelinase inhibitors, acid sphingomyelinase inhibitors, neutral sphingomyelinase inhibitors, alkaline sphingomyelinase inhibitors physiological sphingomyelinase inhibitors, sphingomyelin analogs, scyphostatin, scyphostatin analogs, and L-carnitine.

In some embodiments, the agent that inhibits ceramide synthesis is selected from the group consisting of sphingofungins, lipoxamycin, myriocin, L- cyclosehne, β-chloro-L-alanine, Viridiofungins, Fumonisin B, Fumonisin B1 , N- acylated Fumonisin B1 , O-deacylated Fumonisin B1 , Fumonisins, AAL-toxin, Australifungins, cyclopropene-containing sphingolipid, a-ketoamide, urea analogs of cyclopropene-containing sphingolipid, thiourea analogs of cyclopropene-containing sphingolipid, tyclodecan-9-xanthogenate, L-α-

phosphatidyl-D-myo-inositol-3,5-bisphosphate, L-α-phosphatidyl-D-myo-inositol-3,4,5-thphosphate ceramide-1 -phosphate, sphingosine-1 -phosphate, glutathione, desipramine, imipramine, SR33557, (3-carbazol-9-yl-propyl)-[2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-ethyl)-methyl-amine, Hexanoic acid (2-cyclo-pent-1 -enyl-2-hydroxy-1 -hydroxy-methyl-ethyl)-amide, C11AG, GW4869, scyphostatin, macquarinnicin A, alutenusin, chlorogentisylquinone manunnycin A, α-Mangostin, spiroepoxide 1 ,sphingolactones, 3-O- methylsphingomyelin, 3-O-ethylsphingomyelin, analogs of sphingolyelin, [3 (10,11 -Dihydro-dibenzo [b, f] azepin-5-yl) - N-propyl] - [2 (3,4-dimethoxyphenyl) - ethyl] methylamin, [3 (10,11-Dihydro-dibenzo [b, f] azepin-5-yl) - N-propyl] - [2 (4-methoxyphenyl) - ethyl] methylamin, [2 (3,4-Dimethoxyphenyl) - ethyl] - [3 (2-chlorphenothiazin-IO-yl) - N-propyl] -methylamin, [2 (4-Methoxyphenyl) - ethyl] - [3 (2-chlorphenothiazin-I O-yl) - N-propyl] - methylamin, [3 (Carbazol-9-yl) - N-propyl] - [2 (3,4-dimethoxyphenyl) -ethyl] methylamin, [3 (Carbazol-9-yl) - N-propyl] - [2 (4-methoxyphenyl) - ethyl] methylamin, [2 (3,4-Dimethoxyphenyl) - ethyl] - [2 (phenothiazin-10-yl) - N-ethyl] -methylamin, [2 (4-Methoxyphenyl) - ethyl] - [2 (phenothiazin-10-yl) - N-ethyl] -methylamin, [(3,4-Dimethoxyphenyl) - acetyl] - [3 (2-chlorphenothiazin-I O-yl) - N-propyl] - methylamin, n (1-naphthyl) - N' [2 (3,4-dimethoxyphenyl) - ethyl] - ethyl diamine, n (1 -naphthyl) - N'[2 (4-methoxyphenyl) - ethyl] - ethyl diamine, n [2 (3,4-Dimethoxyphenyl) - ethyl] - n [1 -naphthylmethyl] amine, n [2 (4-Methoxyphenyl) - ethyl] - n [1 -naphthylmethyl] amine, [3 (10.11 - Dihydro dibenzo [b, f] azepin-5-yl) - N-propyl] - [(4-methoxyphenyl) - acetyl] - methylamin, [2 (10,11 -Dihydro-dibenzo [b, f] azepin-5-yl) - N-ethyl] - [2 (3,4-dimethoxyphenyl) -ethyl] methylamin, [2 (10,11 -Dihydro-dibenzo [b, f] azepin-5-yl) - N-ethyl] - [2 (4-methoxyphenyl) - ethyl] - methylamin, [2 (10,11 -Dihydro-dibenzo [b, f] azepin-5-yl) - N-ethyl] - [(4-methoxyphenyl) - acetyl] - methylamin, n [2 (Carbazol-9-yl) - N-ethyl] - N' [2 (4-methoxyphenyl) - ethyl] piperazin, 1 [2 (Carbazol-9-yl) - N-ethyl] -4 [2 (4-methoxyphenyl) - ethyl] - 3,5-dimethylpiperazin, [2 (4-Methoxyphenyl) - ethyl] - [3 (phenoxazin-10-yl) - N-propyl] - methylamin, [3 (5,6,11 ,12-Tetrahydrodibenzo [b, f] azocin) - N-propyl] - [3 (4-methoxyphenyl) - propyl] methylamin, n (5H-Dibenzo [A, D] cycloheptan-5-yl) - N' [2 (4-methoxyphenyl) - ethyl] - propylene diamine, [2 (Carbazol-9-yl) - N-ethyl] - [2 (4-methoxyphenyl) - ethyl] methylamine, scyphostatin, analogs of scyphostatin, L-carnitine, silymarin, 1 -phenyl-2-decanoylaminon-3-morpholino-1 -propanol, 1 -phenyl-2- hexadecanoylaminon-3-pyrrolidino-1-propanol, L-carnitine, human milk bile salt- stimulated lipase, myriocin, cycloserine, 1 -phenyl-2-palmitoyl-3-morpholino-1 - propanol, methylthiodihydroceramide, propanolol, and resveratrol, N-[(1R,2R)-1-(2,3-

dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-1-hydroxy-3-pyrrolidin-1-ylpropan-2-yl]octanamide;(2R,3R)-2,3-dihydroxybutanedioic acid.

The inhibitors of ceramide synthesis disclosed herein are non-exhaustive. One of ordinary skill in the art would appreciate that derivatives, analogs or fragments of these inhibitors would similarly be inhibitory. In addition to the agents described herein are agents that decrease ceramide pathway metabolic enzymes, or increase ceramide catabolic enzymes, including but not limited to agents, which modify, or regulate transcriptional or translational activity or which otherwise degrade, inactivate, or protect theses enzymes.

As used herein, the term "**therapeutically effective amount**" is meant a sufficient amount of the agent that reduces or prevents the increase in ceramide levels for treating or reducing the symptoms at reasonable benefit/risk ratio applicable to any medical treatment. It will be understood that the total daily usage of the compounds and compositions of the present invention will be decided by the attending physician within the scope of sound medical judgment. The specific therapeutically effective dose level for any particular subject will depend upon a variety of factors including the disorder being treated and the severity of the disorder; activity of the specific compound employed; the specific composition employed, the age, body weight, general health, sex and diet of the subject; the time of administration, route of administration, and rate of excretion of the specific compound employed; the duration of the treatment; drugs used in combination with the active ingredients; and like factors well known in the medical arts. For example, it is well within the skill of the art to start doses of the compound at levels lower than those required to achieve the desired therapeutic effect and to gradually increase the dosage until the desired effect is achieved. However, the daily dosage of the products may be varied over a wide range from 0.01 to 1,000 mg per adult per day. Typically, the compositions contain 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 250 and 500 mg of the active ingredient for the symptomatic adjustment of the dosage to the subject to be treated. A medicament typically contains from about 0.01 mg to about 500 mg of the active ingredient, typically from 1 mg to about 100 mg of the active ingredient. An effective amount of the drug is ordinarily supplied at a dosage level from 0.0002 mg/kg to about 20 mg/kg of body weight per day, especially from about 0.001 mg/kg to 7 mg/kg of body weight per day.

Typically the agent that reduces or prevents the increase in ceramide levels is combined with pharmaceutically acceptable excipients, and optionally sustained-release matrices, such as biodegradable polymers, to form pharmaceutical compositions. The term "**Pharmaceutically**" or "**pharmaceutically acceptable**" refers to molecular entities and compositions that do not produce an adverse, allergic or other untoward reaction when administered to a mammal, especially a human, as appropriate. A pharmaceutically acceptable carrier or excipient refers to a non-toxic solid, semi-solid or liquid filler, diluent, encapsulating material or formulation auxiliary of any type. The carrier can also be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetables oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminium monostearate and gelatin. In the pharmaceutical compositions of the present invention, the active ingredients of the invention can be administered in a unit administration form, as a mixture with conventional pharmaceutical supports. Suitable unit administration forms comprise oral-route forms such as tablets, gel capsules, powders, granules and oral suspensions or solutions, sublingual and buccal administration forms, aerosols, implants, subcutaneous, transdermal, topical, intraperitoneal, intramuscular, intravenous, subdermal, transdermal, intrathecal and intranasal administration forms and rectal administration forms.

A further object of the present invention relates to a method of determining whether a patient suffering from a cancer will achieve a response with immunotherapy comprising determining the level of at least one ceramide metabolite in a blood sample from the patient wherein said level correlates with the response of the patient to immunotherapy.

In some embodiments, the blood sample is a plasma sample.

In some embodiments, the method comprises the steps of i) determining the level of at least one ceramide metabolite in the blood sample, ii) comparing the level determined at step i) with a

predetermine reference level wherein differential between the determined level and the predetermined reference level indicates whether the patient will achieve or not a response to immunotherapy.

In some embodiments, when level of C14:0, C18:0 or C22:0 dihexosylceramide is higher that its predetermined reference level, it is concluded that the patient will not achieve a response to immunotherapy (i.e. "non responder"). In some embodiments, when level of C16:0 or C18:0 trihexosylceramide is higher that its predetermined reference level, it is concluded that the patient will not achieve a response to immunotherapy (i.e. "non responder"). In some embodiments, when the level of C22:0 ceramides or C22:1 dihydroceramides is higher that its predetermined reference level, it is concluded that the patient will achieve a response.

The invention will be further illustrated by the following figures and examples. However, these examples and figures should not be interpreted in any way as limiting the scope of the present invention.

FIGURES:

Figure 1. TNF modulates the expression of genes involved in ceramide metabolism regulation. Gene Ontology pathway analysis from RNA Seq data generated in human melanoma cell line (WM35) incubated with 50 ng/mL TNF for 24.

Figure 2: TNF increases the levels of various ceramide metabolites. Human melanoma cell line (WM35) was incubated with or without 50 ng/mL TNF for 48h. Intracellular ceramide metabolites were quantified by mass spectrometry. Ceramide metabolites, which significantly increased upon TNF treatment, are indicated (SM: sphingomyelin; dhSM: dihydrosphingomyelin; Cer: ceramide; dhCer: dihydroceramide; HexCer: monhexosylceramide; CDH: dihexosylceramide). Numbers of carbons and double bonds on the fatty acid linked to the sphingosine backbone are indicated, respectively.

Figure 3: Exogenous ceramides trigger melanoma cell dedifferentiation. WM35 melanoma cell lines were incubated with (C2-Cer) or without (NT) cell permeant ceramides (ceramides C2:0) for 24h. Melan-a expression was evaluated by flow cytometry.

Figure 4: Fumonisin B1 impairs TNF-induced melanoma cell dedifferentiation. WM35 melanoma cells were incubated with 5 uM fumonisin B1 (FB1) and 50 ng/mL TNF for 72 hours. Melan-a expression was evaluated by flow cytometry.

Figure 5: Ceramide metabolite plasma levels in advanced melanoma patients at baseline. Ceramide metabolites were monitored by mass spectrometry in plasma samples from advanced melanoma patients before administering ipilimumab and nivolumab. Cer: ceramide; dhCer: dihydroceramide; CDH: dihexosylceramide. Numbers of carbons and double bonds on the fatty acid linked to the sphingosine backbone are indicated, respectively. P: progressors; R: Responders.

Figure 6: Ceramide metabolite plasma levels in advanced melanoma patients at week 6. Ceramide metabolites were monitored by mass spectrometry in plasma samples from advanced melanoma patients at week 6 after administering ipilimumab and nivolumab. CDH: dihexosylceramide. CTH: trihexosylceramide. Numbers of carbons and double bonds on the fatty acid linked to the sphingosine backbone are indicated, respectively. Tot CDH: total dihexosylceramides. P: progressors; R: Responders.

EXAMPLE:

Incubation of melanoma cell lines with recombinant TNF triggered a melanoma cell dedifferentiation process as evaluated by transcriptomic, western blot and flow cytometry experiments (**data not shown**). The maximum dedifferentiation effect at the mRNA levels was observed at 24h post TNF treatment (**data not shown**).

Analysis of the gene ontology sphingolipid pathways from the RNA Seq experiments suggested that TNF likely increases the sphingolipid biosynthetic pathway while reducing the ganglioside synthesis from the dihexosylceramide (**Figure 1**).

TNF triggered the increase of various ceramide metabolites as evaluated by mass spectrometry, including some (dihydro)sphingomyelins, (dihydro)ceramides, monohexoxylceramides and dihexosylceramides (**Figure 2**).

Incubation of melanoma cells with exogenous ceramides trigger the decrease of MELAN-A expression, indicating that ceramides or ceramide metabolites can induce melanoma cell dedifferentiation (**Figure 3**).

TNF-induced melanoma cell dedifferentiation is impaired by fumonisin B1, an inhibitor of the *de novo* ceramide synthesis, further indicating that ceramides or ceramide metabolites can induce melanoma cell dedifferentiation (**Figure 4**).

To evaluate whether ceramide metabolite plasma levels can predict the clinical outcome in advanced melanoma patients treated with ipilimumab and nivolumab at week 12, ceramide metabolites were assessed by mass spectrometry at baseline (**Figure 5**) and week 6 post-treatment induction (**Figure 6**). C14:0 and C18:0 dihexosylceramide plasma levels were higher at baseline and at week 6 in non-responders than in responders. In addition, C22:0 dihexosylceramide and total dihexosylceramide as well as C16:0 and C18:0 trihexosylceramides plasma levels were higher in non-responders at week 6 (**Figure 6**). Finally, C22:0 ceramides and C22:1 dihydroceramides were higher in responders at baseline (**Figure 5**). Collectively, our data indicate that glycosphingolipid pattern in plasma can predict the clinical outcome of advanced melanoma treated with ipilimumab and nivolumab.

REFERENCES:

Throughout this application, various references describe the state of the art to which this invention pertains. The disclosures of these references are hereby incorporated by reference into the present disclosure.

Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Lao CD, Cowey CL, Schadendorf D, Wagstaff J, Dummer R, Ferrucci PF, Smylie M, Butler MO, Hill A, Márquez-Rodas I, Haanen JBAG, Guidoboni M, Maio M, Schöffski P, Carlino MS, Lebbé C, McArthur G, Ascierto PA, Daniels GA, Long GV, Bas T, Ritchings C, Larkin J, Hodi FS. Long-Term Outcomes With Nivolumab Plus Ipilimumab or Nivolumab Alone Versus Ipilimumab in Patients With Advanced Melanoma. J Clin Oncol. 2022 Jan 10;40(2):127-137.

Montfort A, Bertrand F, Rochotte J, Gilhodes J, Filleron T, Milhès J, Dufau C, Imbert C, Riond J, Tosolini M, Clarke CJ, Dufour F, Constantinescu AA, Junior NF, Garcia V, Record M, Cordelier P, Brousset P, Rochaix P, Silvente-Poirot S, Therville N, Andrieu-Abadie N, Levade T, Hannun YA, Benoist H, Meyer N, Micheau O, Colacios C, Ségui B. Neutral

Sphingomyelinase 2 Heightens Anti-Melanoma Immune Responses and Anti-PD-1 Therapy Efficacy. Cancer Immunol Res. 2021 May;9(5):568-582.

Imbert C, Montfort A, Fraisse M, Marcheteau E, Gilhodes J, Martin E, Bertrand F, Marcellin M, Burlet-Schiltz O, Peredo AG, Garcia V, Carpentier S, Tartare-Deckert S, Brousset P, Rochaix P, Puisset F, Filleron T, Meyer N, Lamant L, Levade T, Ségui B, Andrieu-Abadie N, Colacios C. Resistance of melanoma to immune checkpoint inhibitors is overcome by targeting the sphingosine kinase-1. Nat Commun. 2020 Jan 23;11(1):437.

Carrié L, Virazels M, Dufau C, Montfort A, Levade T, Ségui B, Andrieu-Abadie N. New Insights into the Role of Sphingolipid Metabolism in Melanoma. Cells. 2020 Aug 26;9(9):1967.

Bilal F, Montfort A, Gilhodes J, Garcia V, Riond J, Carpentier S, Filleron T, Colacios C, Levade T, Daher A, Meyer N, Andrieu-Abadie N, Ségui B. Sphingomyelin Synthase 1 (SMS1) Downregulation Is Associated With Sphingolipid Reprogramming and a Worse Prognosis in Melanoma. Front Pharmacol. 2019 Apr 30;10:443. doi: 10.3389/fphar.2019.00443.

Levade T, Andrieu-Abadie N, Micheau O, Legembre P, Ségui B. Sphingolipids modulate the epithelial-mesenchymal transition in cancer. Cell Death Discov. 2015 Oct 12;1:15001.

Montfort A, Colacios C, Levade T, Andrieu-Abadie N, Meyer N, Ségui B. The TNF Paradox in Cancer Progression and Immunotherapy. Front Immunol. 2019 Jul 31;10:1818.

Bertrand F, Montfort A, Marcheteau E, Imbert C, Gilhodes J, Filleron T, Rochaix P, Andrieu-Abadie N, Levade T, Meyer N, Colacios C, Ségui B. TNFα blockade overcomes resistance to anti-PD-1 in experimental melanoma. Nat Commun. 2017 Dec 22;8(1):2256.

Perez-Ruiz E, Minute L, Otano I, Alvarez M, Ochoa MC, Belsue V, de Andrea C, Rodriguez-Ruiz ME, Perez-Gracia JL, Marquez-Rodas I, Llacer C, Alvarez M, de Luque V, Molina C, Teijeira A, Berraondo P, Melero I. Prophylactic TNF blockade uncouples efficacy and toxicity in dual CTLA-4 and PD-1 immunotherapy. Nature. 2019 May;569(7756):428-432.

Landsberg J, Kohlmeyer J, Renn M, Bald T, Rogava M, Cron M, Fatho M, Lennerz V, Wölfel T, Hölzel M, Tüting T. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. Nature. 2012 Oct 18;490(7420):412-6.

CLAIMS:

1. A method of overcoming immunotherapy resistance in patient suffering from cancer thereof comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of an agent that reduces or prevents the increase in ceramide and glycosylated ceramide levels.

2. The method of claim 1 wherein the patient suffers from melanoma.

3. The method of claim 1 wherein the immunotherapy consists in administering the patient with at least one immune checkpoint inhibitor.

4. The method of claim 3 wherein the immune checkpoint inhibitor is selected from the group consisting of PD-1 antagonists, PD-L1 antagonists, PD-L2 antagonists, CTLA-4 antagonists, VISTA antagonists, TIM-3 antagonists, LAG-3 antagonists, IDO antagonists, KIR2D antagonists, A2AR antagonists, B7-H3 antagonists, B7-H4 antagonists, and BTLA antagonists.

5. The method of claim 3 wherein the immunotherapy consists in administering to the patient a combination of a CTLA-4 antagonist and a PD-1 antagonist.

6. The method of claim 1 wherein the agent that inhibits ceramide synthesis is selected from the group consisting of serine palmitoyltransferase inhibitors, ceramide synthase inhibitors, dihydroceramide desaturase inhibitors, sphingomyelinase inhibitors, acid sphingomyelinase inhibitors, neutral sphingomyelinase inhibitors, alkaline sphingomyelinase inhibitors physiological sphingomyelinase inhibitors, sphingomyelin analogs, scyphostatin, scyphostatin analogs, and L-carnitine.

7. The method of claim 6 wherein the agent that inhibits ceramide synthesis is selected from the group consisting of sphingofungins, lipoxamycin, myriocin, L- cyclosehne, β-chloro-L-alanine, Viridiofungins, Fumonisin B, Fumonisin B1 , N- acylated Fumonisin B1 , O-deacylated Fumonisin B1 , Fumonisins, AAL-toxin, Australifungins, cyclopropene-containing sphingolipid, a-ketoamide, urea analogs of cyclopropene-containing sphingolipid, thiourea analogs of cyclopropene-containing sphingolipid, tyclodecan-9-xanthogenate, L-α-phosphatidyl-D-myo-inositol-3,5-bisphosphate, L-α-phosphatidyl-D-myo-inositol-3,4,5-thphosphate ceramide-1 -phosphate, sphingosine-1 -phosphate, glutathione, desipramine, imipramine, SR33557, (3-carbazol-9-yl-propyl)-

[2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-ethyl)-methyl-amine, Hexanoic acid (2-cyclo-pent-1 -enyl-2-hydroxy-1 -hydroxy-methyl-ethyl)-amide, C11AG, GW4869, scyphostatin, macquarinnicin A, alutenusin, chlorogentisylquinone manunnycin A, α-Mangostin, spiroepoxide 1 ,sphingolactones, 3-O- methylsphingomyelin, 3-O-ethylsphingomyelin, analogs of sphingolyelin, [3 (10,11 -Dihydro-dibenzo [b, f] azepin-5-yl) - N-propyl] - [2 (3,4-dimethoxyphenyl) - ethyl] methylamin, [3 (10,11-Dihydro-dibenzo [b, f] azepin-5-yl) - N-propyl] - [2 (4-methoxyphenyl) - ethyl] methylamin, [2 (3,4-Dimethoxyphenyl) - ethyl] - [3 (2-chlorphenothiazin-IO-yl) - N-propyl] -methylamin, [2 (4-Methoxyphenyl) - ethyl] - [3 (2-chlorphenothiazin-I O-yl) - N-propyl] - methylamin, [3 (Carbazol-9-yl) - N-propyl] - [2 (3,4-dimethoxyphenyl) -ethyl] methylamin, [3 (Carbazol-9-yl) - N-propyl] - [2 (4-methoxyphenyl) - ethyl] methylamin, [2 (3,4-Dimethoxyphenyl) - ethyl] - [2 (phenothiazin-10-yl) - N-ethyl] - methylamin, [2 (4-Methoxyphenyl) - ethyl] - [2 (phenothiazin-10-yl) - N-ethyl] - methylamin, [(3,4-Dimethoxyphenyl) - acetyl] - [3 (2-chlorphenothiazin-I O-yl) - N-propyl] - methylamin, n (1-naphthyl) - N' [2 (3,4-dimethoxyphenyl) - ethyl] - ethyl diamine, n (1 -naphthyl) - N'[2 (4-methoxyphenyl) - ethyl] - ethyl diamine, n [2 (3,4-Dimethoxyphenyl) - ethyl] - n [1 -naphthylmethyl] amine, n [2 (4-Methoxyphenyl) - ethyl] - n [1 -naphthylmethyl] amine, [3 (10.11 - Dihydro dibenzo [b, f] azepin-5-yl) - N-propyl] - [(4-methoxyphenyl) - acetyl] - methylamine, [2 (10,11 -Dihydro-dibenzo [b, f] azepin-5-yl) - N-ethyl] - [2 (3,4-dimethoxyphenyl) -ethyl] methylamine, [2 (10,11 -Dihydro-dibenzo [b, f] azepin-5-yl) - N-ethyl] - [2 (4-methoxyphenyl) - ethyl] - methylamine, [2 (10,11 -Dihydro-dibenzo [b, f] azepin-5-yl) - N-ethyl] - [(4-methoxyphenyl) - acetyl] - methylamine, n [2 (Carbazol-9-yl) - N-ethyl] - N' [2 (4-methoxyphenyl) - ethyl] piperazine, 1 [2 (Carbazol-9-yl) - N-ethyl] -4 [2 (4-methoxyphenyl) - ethyl] - 3,5-dimethylpiperazine, [2 (4-Methoxyphenyl) - ethyl] - [3 (phenoxazin-10-yl) - N-propyl] - methylamine, [3 (5,6,11 ,12- Tetrahydrodibenzo [b, f] azocin) - N-propyl] - [3 (4-methoxyphenyl) - propyl] methylamine, n (5H-Dibenzo [A, D] cycloheptan-5-yl) - N' [2 (4-methoxyphenyl) - ethyl] - propylene diamine, [2 (Carbazol-9-yl) - N-ethyl] - [2 (4-methoxyphenyl) - ethyl] methylamine, scyphostatin, analogs of scyphostatin, L-carnitine, silymarin, 1 -phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1 -propanol, 1 -phenyl-2- hexadecanoylamino-3-pyrrolidino-1-propanol, L-camitine, myriocin, cycloserine, 1 -phenyl-2-palmitoyl-3-morpholino-1 - propanol, methylthiodihydroceramide, propranolol, and resveratrol, N-[(1R,2R)-1-(2,3-dihydro-

1,4-benzodioxin-6-yl)-1-hydroxy-3-pyrrolidin-1-ylpropan-2-yl]octanamide;(2R,3R)-2,3-dihydroxybutanedioic acid.

8. The method of claim 1 that comprises administering to the patient a therapeutically effective combination of the agent that reduces or prevents the increase in ceramide or glycosylated ceramide levels with a TNFα blocking agent.

9. A method of determining whether a patient suffering from a cancer will achieve a response with immunotherapy comprising determining the level of at least one ceramide metabolite in a blood sample from the patient wherein said level correlates with the response of the patient to immunotherapy.

10. The method of claim 1 that comprises the steps of i) determining the level of at least one ceramide metabolite in the blood sample, ii) comparing the level determined at step i) with a predetermined reference level wherein differential between the determined level and the predetermined reference level indicates whether the patient will achieve or not a response to immunotherapy.

11. The method of claim 10 wherein when level of C14:0, C18:0 or C22:0 dihexosylceramide (CDH) is higher that its predetermined reference level, it is concluded that the patient will not achieve a response to immunotherapy (i.e. "non responder").

12. The method of claim 10 wherein when level of C16:0 or C18:0 trihexosylceramide (CTH) is higher that its predetermined reference level, it is concluded that the patient will not achieve a response to immunotherapy (i.e. "non responder").

13. The method of claim 10 wherein when the level of C22:0 ceramides or C22:1 dihydroceramides is higher that its predetermined reference level, it is concluded that the patient will achieve a response.

ABSTRACT OF THE INVENTION

INHIBITORS OF THE CERAMIDE METABOLIC PATHWAY FOR OVERCOMING IMMUNOTHERAPY RESISTANCE IN CANCER

Advanced cutaneous melanoma can be treated by immunotherapy targeting immune check points such as PD-1 and CTL-A4. However, 50% of patients do no respond because of primary or acquired resistance mechanism. Thus, new targets for addressing the treatment of said resistance are highly needed. The inventors show that TNF (Tumour Necrosis Factor) and ceramide metabolism alterations in melanoma cells contribute to melanoma progression and resistance to immunotherapies. In particular, the inventors demonstrate that TNF is a potent modulator of ceramide metabolism and TNF-mediated ceramide metabolism changes contribute to various biological processes such as cell proliferation, cell death and cell differentiation. Among the biological processes by which TNF triggers melanoma immune escape and resistance to immunotherapies, TNF triggers a dedifferentiation process of melanoma cells associated with the reduction of melanocytic antigen expression and epithelial to mesenchymal transition. Finally, the inventors show that glycosphingolipid pattern in plasma can predict the clinical outcome of advanced melanoma treated with ipilimumab and nivolumab. Accordingly, ceramide metabolites and metabolizing-enzymes can be new therapeutic targets and/or biomarkers in advanced melanoma patients treated with immunotherapies.

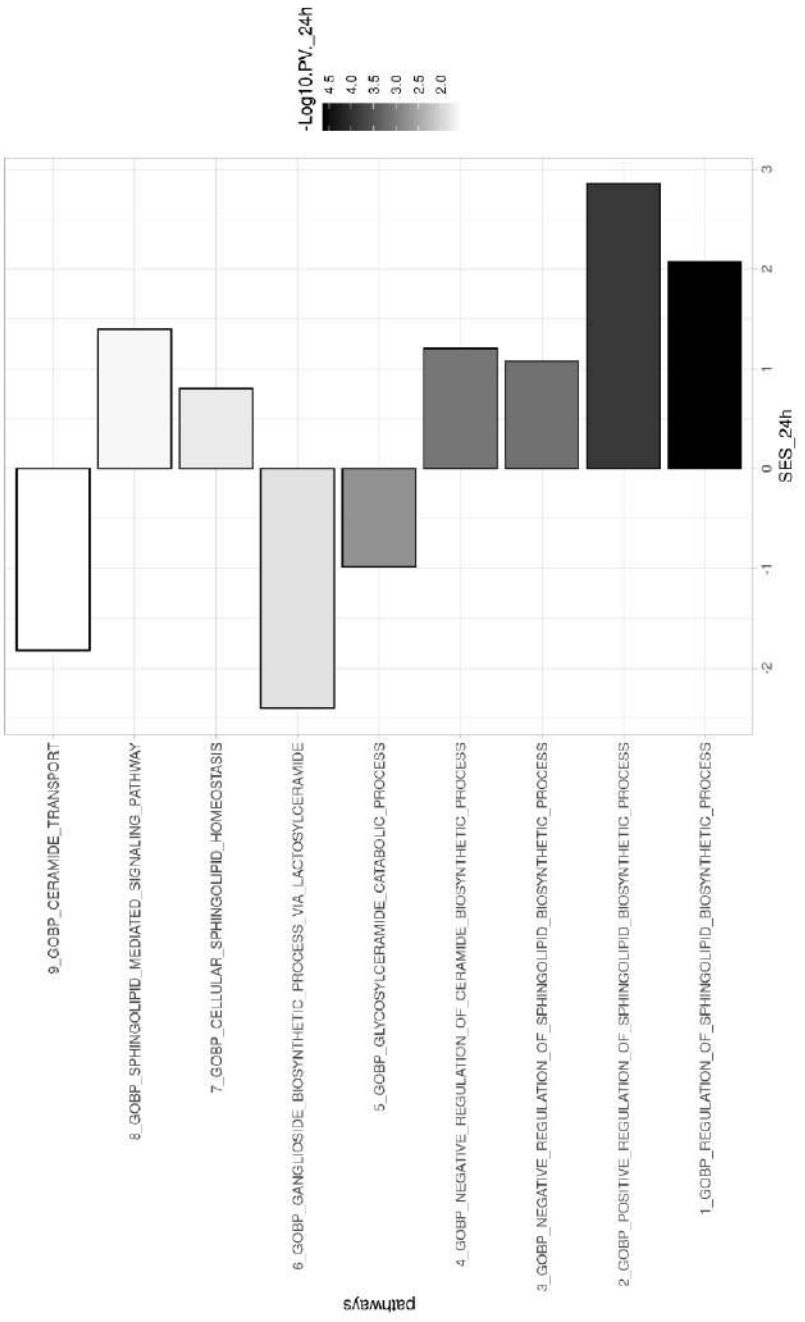

-Log10.PV._24h
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
SES_24h
3
2
1
0
-1
-2
9_GOBP_CERAMIDE_TRANSPORT
8_GOBP_SPHINGOLIPID_MEDIATED_SIGNALING_PATHWAY
7_GOBP_CELLULAR_SPHINGOLIPID_HOMEOSTASIS
6_GOBP_GANGLIOSIDE_BIOSYNTHETIC_PROCESS_VIA_LACTOSYLCERAMIDE
5_GOBP_GLYCOSYLCERAMIDE_CATABOLIC_PROCESS
4_GOBP_NEGATIVE_REGULATION_OF_CERAMIDE_BIOSYNTHETIC_PROCESS
3_GOBP_NEGATIVE_REGULATION_OF_SPHINGOLIPID_BIOSYNTHETIC_PROCESS
2_GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_SPHINGOLIPID_BIOSYNTHETIC_PROCESS
1_GOBP_REGULATION_OF_SPHINGOLIPID_BIOSYNTHETIC_PROCESS
pathways

Figure 1

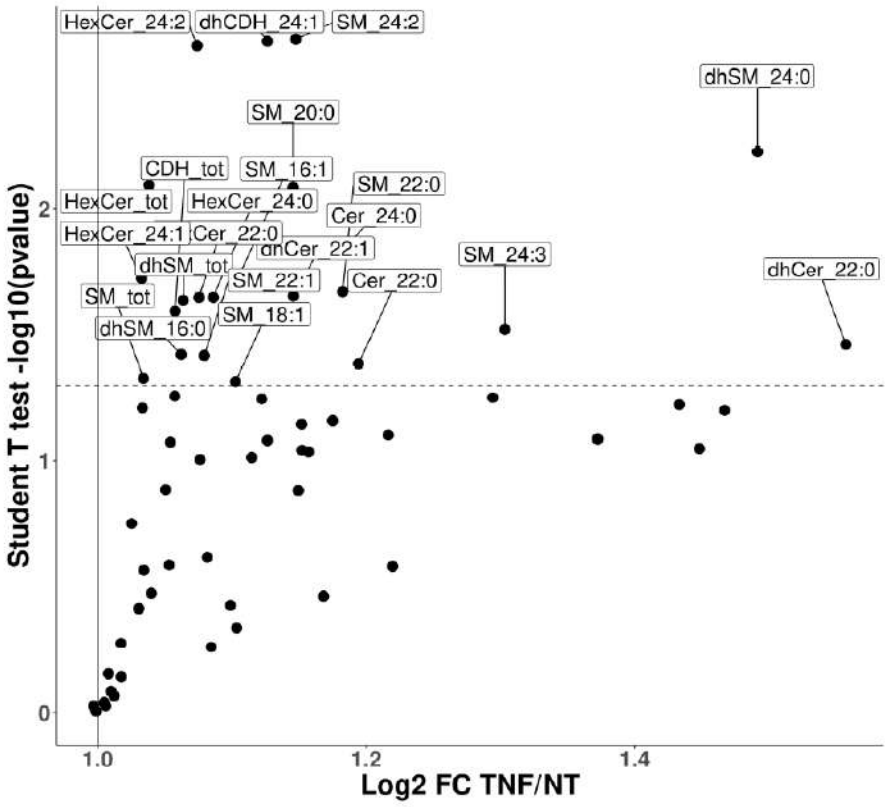

HexCer_24:2
dhCDH_24:1
SM_24:2
dhSM_24:0
SM_20:0
CDH_tot
SM_16:1
SM_22:0
HexCer_tot
HexCer_24:0
Cer_24:0
HexCer_24:1
Cer_22:0
dhCer_22:1
SM_24:3
dhCer_22:0
dhSM_tot
SM_22:1
Cer_22:0
SM_tot
SM_18:1
dhSM_16:0
Student T test -log10(pvalue)
2
1
0
1.0
1.2
1.4
Log2 FC TNF/NT

Figure 2

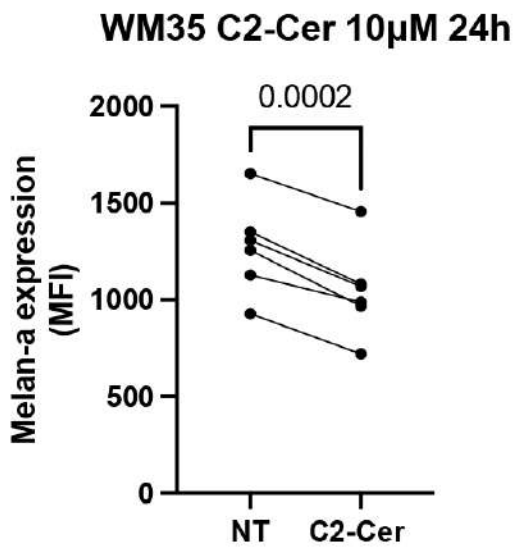


Figure 3

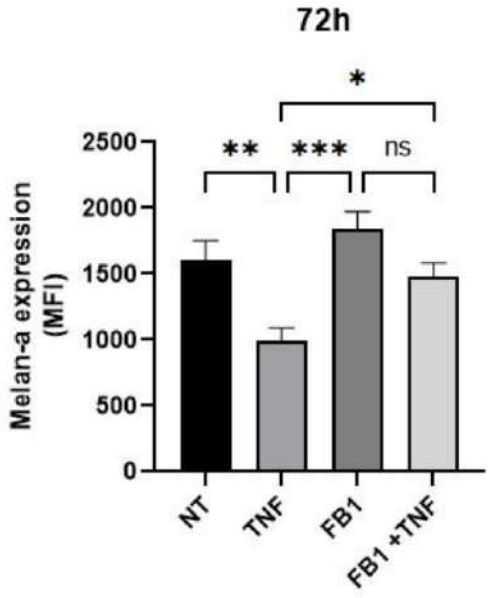


Figure 4

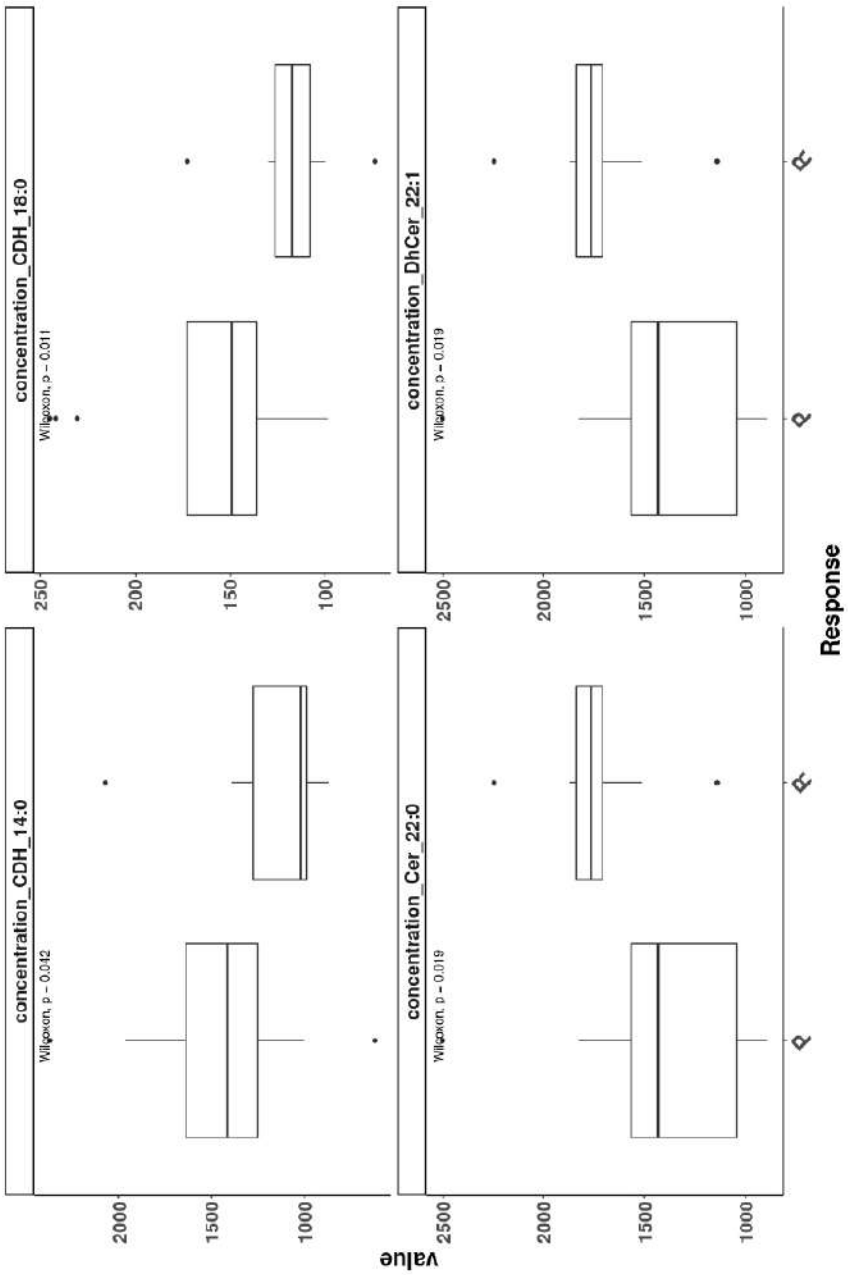

concentration_CDH_18:0
Wilcoxon, p = 0.011
concentration_DhCer_22:1
Wilcoxon, p = 0.019
concentration_CDH_14:0
Wilcoxon, p = 0.042
concentration_Cer_22:0
Wilcoxon, p = 0.019
value
Response
Q
R

Figure 5

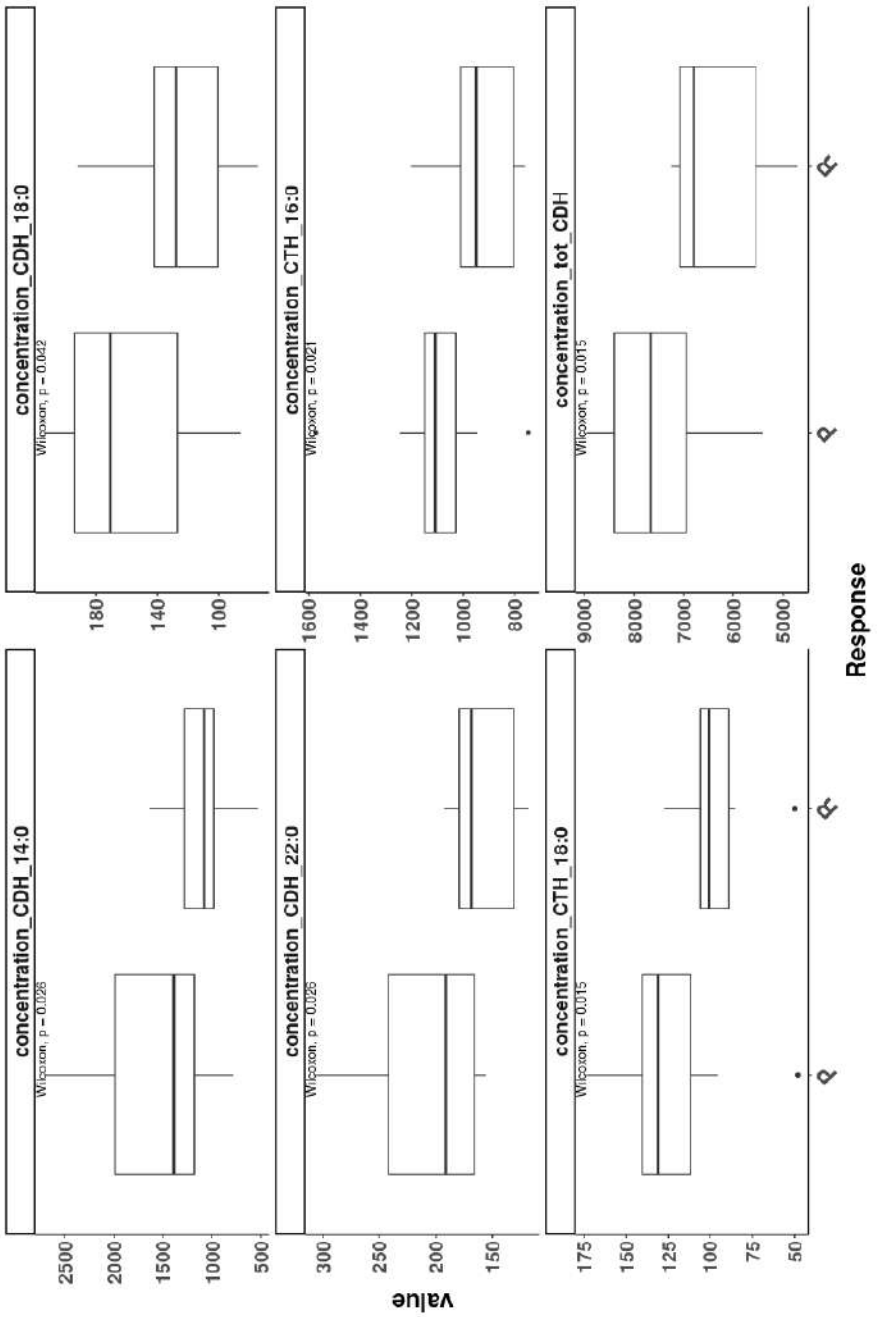

concentration_CDH_18:0
Wilcoxon, p = 0.042
concentration_CTH_16:0
Wilcoxon, p = 0.021
concentration_tot_CDH
Wilcoxon, p = 0.015
concentration_CDH_14:0
Wilcoxon, p = 0.026
concentration_CDH_22:0
Wilcoxon, p = 0.026
concentration_CTH_18:0
Wilcoxon, p = 0.015
value
Response

Figure 6

cells

MDPI

Review

New Insights into the Role of Sphingolipid Metabolism in Melanoma

Lorry Carrié [1,†], Mathieu Virazels [1,†], Carine Dufau [1,†], Anne Montfort [1], Thierry Levade [1,2], Bruno Ségui [1,‡] and Nathalie Andrieu-Abadie [1,*,‡]

[1] Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Equipe Labellisée Fondation ARC, Université Fédérale de Toulouse Midi-Pyrénées, Université Toulouse III Paul-Sabatier, Inserm 1037, 2 avenue Hubert Curien, CS 53717, 31037 Toulouse CEDEX 1, France; lorry.carrie@inserm.fr (L.C.); mathieu.virazels@inserm.fr (M.V.); carine.dufau@inserm.fr (C.D.); anne.montfort@inserm.fr (A.M.); thierry.levade@inserm.fr (T.L.); bruno.segui@inserm.fr (B.S.)

[2] Laboratoire de Biochimie Métabolique, CHU, 31059 Toulouse, France

* Correspondence: nathalie.andrieu@inserm.fr; Tel.: +33-582-7416-20

† These authors contributed equally to this work.

‡ These authors jointly supervised this work.

Received: 17 July 2020; Accepted: 24 August 2020; Published: 26 August 2020



Abstract: Cutaneous melanoma is a deadly skin cancer whose aggressiveness is directly linked to its metastatic potency. Despite remarkable breakthroughs in term of treatments with the emergence of targeted therapy and immunotherapy, the prognosis for metastatic patients remains uncertain mainly because of resistances. Better understanding the mechanisms responsible for melanoma progression is therefore essential to uncover new therapeutic targets. Interestingly, the sphingolipid metabolism is dysregulated in melanoma and is associated with melanoma progression and resistance to treatment. This review summarises the impact of the sphingolipid metabolism on melanoma from the initiation to metastatic dissemination with emphasis on melanoma plasticity, immune responses and resistance to treatments.

Keywords: cancer; ceramide; gangliosides; immunotherapy; metastasis; phenotype switching; sphingosine 1-phosphate

1. Introduction

Cutaneous melanoma is a skin cancer whose incidence is increasing significantly worldwide (Figure 1). Even though melanoma is not frequent, accounting for less than 5% of skin cancers, it can be very aggressive and causes more than 75% of all skin cancer deaths [1] (Figure 1). Despite significant improvement of treatment strategies in the last decade, owing both to the emergence of BRAF- or MEK-targeted therapies and checkpoint blockade immunotherapies (i.e., anti-cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA4) and anti-programmed cell death-1 (PD-1)), the prognosis for patients with metastatic melanoma remains uncertain, predominantly due to treatment failures and recurrences [2]. Fortunately, melanoma is usually curable by excisional surgery if detected at an early stage, with a high five-year survival rate [3,4]. Thus, a better understanding of melanoma progression processes, before dissemination, is a major public health issue in order to discern new therapeutic targets.

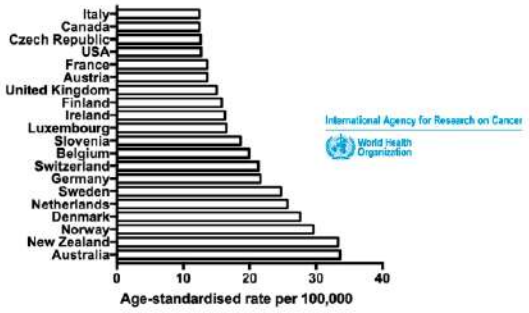
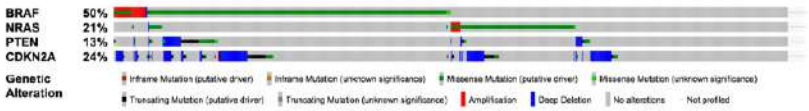


Figure 1. Cutaneous melanoma: the 19th most common cancer worldwide. Estimated age-standardised incidence rates of cutaneous melanoma in the most affected countries in 2018, for both sexes and all ages. Data from the International Agency for Research on Cancer (World Health Organisation).

Melanoma arises from melanocytes, i.e., melanin-producing neural crest-derived cells, which are located at the junction between the epidermis and the dermis [5]. The initial stage of melanomagenesis corresponds to a radial-growth phase (RGP), in which melanoma cells invade laterally but stay confined into the epidermis. This stage is followed by a vertical-growth phase (VGP), in which melanoma cells invade the dermis and are able to reach blood vessels. Then, an extravasation stage, corresponding to the release of melanoma cells from the blood circulation into new tissues, leads to the formation of metastatic niches [6–8]. Melanomagenesis requires at least two key events. The first is activating mutations in oncogenes such as *BRAF* or *NRAS*. BRAF mutations are found in 50% of melanoma patients (Figure 2) and the V600E mutation accounts for approximately 75% of all BRAF mutations detected in cutaneous melanoma [9]. Conversely, the most common NRAS mutations, i.e., Q61R and Q61K, affect about 20% of melanoma patients [10]. Since BRAF and NRAS mutations are mutually exclusives, these driver mutations lead to constitutive activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and aberrant cancer cell proliferation in approximately 70% of patients (Figure 2) [11]. The second event is illustrated by the loss of expression of key tumour suppressor genes such as *PTEN* or cell cycle checkpoint regulators such as *CDKN2A*, which occur in 13% and 24% of patients, respectively (Figure 2). These genetic changes can bypass oncogene-induced senescence (OIS) processes and cause the immortalisation of tumour cells [4,7,12] (Figure 2).



(a)

A	B	NEITHER	A NOT B	B NOT A	BOTH	LOG2 ODDS RATIO	P-VALUE	Q-VALUE	TENDENCY
BRAF	NRAS	241	453	177	28	<-3	<0.001	<0.001	Mutual exclusivity
BRAF	PTEN	392	391	26	90	1.706	<0.001	<0.001	Co-occurrence
PTEN	CDKN2A	606	73	177	43	1.012	<0.001	0.001	Co-occurrence
BRAF	CDKN2A	336	343	82	138	0.721	<0.001	0.001	Co-occurrence
NRAS	PTEN	595	188	99	17	-0.880	0.014	0.017	Mutual exclusivity
NRAS	CDKN2A	534	145	160	60	0.406	0.044	0.044	Co-occurrence

(b)

Figure 2. *BRAF*, *NRAS*, *PTEN* and *CDKN2A* are the most frequently mutated genes in cutaneous melanoma. Mutation rate, genetic alteration (**a**) and mutual exclusivity (**b**) for *BRAF*, *NRAS*, *PTEN* and *CDKN2A* mutations observed in 1635 samples from 1584 patients included in 12 studies analysed on cBioportal for cancer genomics (https://www.cbioportal.org).

Metabolic reprogramming is also crucial for melanomagenesis. Indeed, a shift from mitochondrial oxidative phosphorylation to cytoplasmic anaerobic glycolysis, known as Warburg effect, is required for metastatic dissemination [13]. The present review focuses on alterations in the metabolism of sphingolipids (SL). Interestingly, several key enzymes of the glycolytic pathway can be severely affected by changes in SL metabolism in melanoma. For instance, C16-ceramide, which is the major long-chain ceramide in melanocytes and melanoma cells, impairs pyruvate kinase, hexokinase and LDH activities, consequently altering cellular glycolysis and inhibiting melanoma progression [14].

How modulations of the SL metabolism affect dermatologic diseases have long been studied [15] and accumulating evidence demonstrates the presence of alterations in the ceramide metabolism in melanoma cells. This article aims at providing a comprehensive overview of the effects dysregulations of the SL metabolism have on melanomagenesis, melanoma progression, immunity and resistance to treatment, especially linked to the phenotype switching.

2. Alterations of Sphingolipid Metabolism in Melanoma

The main dysregulation affecting the SL metabolism in melanoma cells is a trend toward a reduction of ceramide, which promotes cell death (for review, see [16]). This is associated with changes in the expression and/or activity of a number of enzymes as well as the accumulation of tumour-promoting metabolites, which include sphingosine 1-phosphate (S1P) and gangliosides (Figure 3).

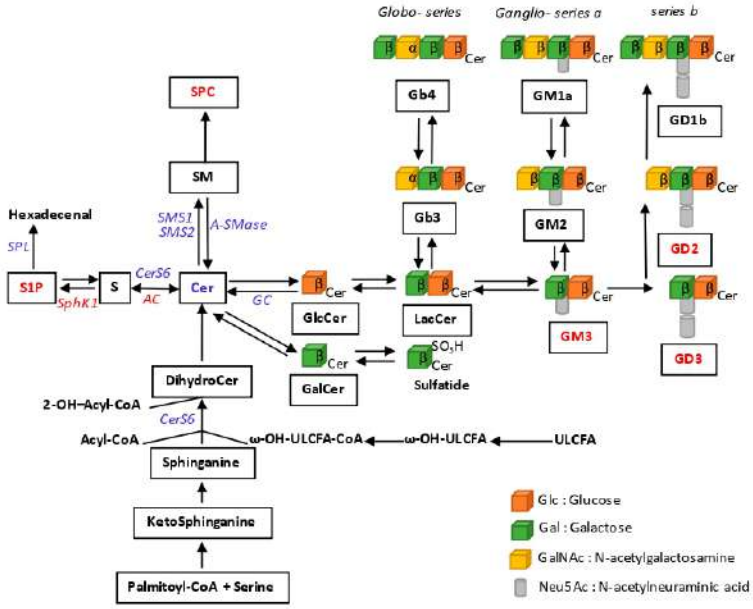


Figure 3. Multiple dysregulations of sphingolipid metabolism in melanoma. SL metabolites or SL-metabolising enzymes whose levels or expression are altered in melanoma, are mentioned. Decreases are indicated in blue and increases in red. AC, acid ceramidase; Cer, ceramide; CERS, ceramide synthase; CoA, coenzyme A; DihydroCer, dihydroceramide; GalCer, galactosylceramide; GC, glucosylceramidase; GlcCer, glucosylceramide; LacCer, lactosylceramide; S, sphingosine; S1P, sphingosine 1-phosphate; SM, sphingomyelin; SMases, sphingomyelinases; SMS, sphingomyelin synthase; SPC, sphingosylphosphorylcholine; SphK, sphingosine kinase; SPL, S1P lyase; ULCFA, ultralong chain fatty acids.

The impact of SL metabolism dysregulations in melanoma cell lines and/or patients is summarised in Table 1. For instance, a low expression of the ceramide synthase 6 (CerS6) in melanoma cells is related to malignant behaviours as demonstrated in WM35, WM451 and SKMEL28 human melanoma cell lines [17]. In addition, acid ceramidase (AC), encoded by the *ASAH1* gene, which hydrolyses ceramide into sphingosine, is expressed at high levels in melanocytes and proliferative melanoma cells, as observed in vitro as well as in biopsies from patients with stage II melanoma [18]. *ASAH1* expression was: (i) higher in human melanoma cell lines exhibiting a proliferative phenotype as compared to invasive ones; and (ii) reduced at the invasive front on tumour specimens from melanoma patients [19]. Sphingosine kinase 1 (SphK1), which phosphorylates sphingosine to produce sphingosine-1-phosphate (S1P), also shows increased expression and/or activity in melanoma cells compared to melanocytes, not only in human and murine cell lines [20,21] but also in human biopsies [22]. Collectively, these findings suggest a shift of the S1P-ceramide balance towards S1P production in melanoma cells. In accordance, the expression of *SGPL1* gene, encoding for S1P lyase (SPL), is downregulated in melanoma cell lines when compared to adult or juvenile melanocytes, suggesting that *SGPL1* might be downregulated during melanomagenesis [23].

Ceramide can also be converted into more complex SL, such as gangliosides. For instance, mono- and disialoganglioside levels are very high in human melanoma cells and tissues, especially GD3 [24]. Interestingly, levels of this latter ganglioside were correlated to the expression of the c-Yes tyrosine kinase whose activity is known to increase in melanoma cells as compared to melanocytes [25] and whose inhibition reduced the malignant potential of $GD3^+$ melanoma cells only [26].

Alterations of the ceramide metabolism also include changes in the expression of sphingomyelin synthase 1 (SMS1), which is encoded by the *SGMS1* gene and catalyses the transformation of ceramide into sphingomyelin (SM) [27,28]. *SGMS1* is expressed at low levels in most of the human melanoma biopsies and low *SGMS1* expression is associated with a worse prognosis in metastatic melanoma patients. Of interest, a weak expression of *SMS1* was shown not to be associated with an intracellular accumulation of ceramide, most likely due to its conversion into glucosylceramide (GlcCer) through GlcCer synthase (GCS). Consequently, 6 out of 10 human melanoma cell lines exhibited higher levels of GlcCer than SM [29]. Moreover, SM can also be transformed into sphingosylphosphorylcholine (SPC) by a yet uncharacterised SM deacylase and SPC has been shown to stimulate regulators of melanomagenesis such as extracellular signal-regulated kinases (ERK), microphthalmia-associated transcription factor (MITF) and Akt/mTOR [30–33].

Table 1. Impact of SL and SL-metabolising enzymes dysregulations on melanoma cell lines and patients.

SL or SL-Metabolising Enzymes	Dysregulation	Cell Lines or Patients	Effects	Refs
CerS6	Decreased	WM35, WM451 and SKMEL28 human melanoma cells	Malignant behaviour	[17]
AC	Decreased	Proliferative and invasive human melanoma cells	Pro-invasive	[18,19]
SphK1	Increased	Murine and human melanoma cells and biopsies	Pro-tumoral Immunosuppressive signature	[20–22]
SPL	Decreased	Human melanoma cells	Resistance to chemotherapy Increased proliferation	[23]
GD3	Increased	GD3+ human melanoma cells with c-Yes inhibition	Reduced malignancy	[24–26]
SMS1	Decreased	Human biopsies	Worse prognosis	[29]

Table 1. *Cont.*

SL or SL-Metabolising Enzymes	Dysregulation	Cell Lines or Patients	Effects	Refs
SPC	Increased	Mel-Ab and human melanocytes	Stimulate melanomagenesis Hypopigmentation in melanocytes	[30–33]
A-SMase	Decreased	Primary melanomas and lymph node metastases Pigmented murine and human melanomas	Inverse correlation with melanin content	[34,35]

Finally, the expression of acid sphingomyelinase (A-SMase), which hydrolyses SM into ceramide, has been shown to be higher in benign nevi than in primary melanomas, and further reduced in the lymph-node metastases [34]. Moreover, a lower expression/activity of A-SMase was observed in hyper-pigmented murine and human melanomas as compared to the hypo-pigmented ones, suggesting an inverse correlation between A-SMase expression/activity and melanin content. In accordance, exogenous C2-ceramide decreased melanin content in melanocytes [35].

3. Role of the Sphingolipid Metabolism in Melanomagenesis

3.1. Do SL Metabolism Alterations Increase the Risk to Develop Melanoma?

A genome-wide association study has identified the 1q21.3 chromosomal region, containing LASS2 gene that encodes ceramide synthase 2 (CerS2), as a locus predisposing to cutaneous melanoma [36]. These observations suggest the involvement of some genetic determinants of the ceramide metabolism in melanoma predisposition. Interestingly, a defect in glucosylceramidase 1 (GBA1) resulting in Gaucher inborn disorder (GD), owing to a defect in GlcCer hydrolysis into ceramide, is associated with an increased risk of malignancies, including melanoma [37,38]. Indeed, accumulation of GlcCer as well as glucosylsphingosine, which arises from the cleavage of excess GlcCer by AC [39,40], occurs in macrophages and could severely alter the immune and inflammatory responses. This could create a favourable microenvironment to promote melanomagenesis (for review see [38]).

Another hypothetical link between glucosylceramidase (GC) and melanoma development is autophagy, which can be either cell protective, promoting their survival, or lethal, via induction of a programmed-cell death mechanism [41,42]. Defective autophagy has been reported in models of GC or saposin C deficiency [43]. Accumulation of GlcCer was associated to autophagy dysfunction in a drosophila model of GD that lacked the two fly GBA1 orthologues [44]. In accordance, GlcCer accumulation was also associated with autophagy impairment and defective autophagosome-lysosome fusion, resulting in autophagosome accumulation in induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from patients with GD [45]. Moreover, an hyperactivation of the autophagic inhibitor mTOR and a downregulation of the master regulator of lysosome function TFEB were reported in human neuroglioma cells treated with the GC inhibitor conduritol B epoxide [46]. Numerous studies have shown that impaired autophagy can favour melanoma development. Indeed, the activation of mTOR was associated with poor prognosis in melanoma patients [47]. In addition, ERK-induced TFEB phosphorylation impaired expression of autophagy-lysosome target genes in BRAF-mutated melanoma, which elicited the formation of TGF-β-dependent metastases [48].

All these findings indicate a possible link between GC deficiency and melanomagenesis, that may result from an altered immune response or disturbed autophagy. The underlying mechanisms remain, however, to be determined.

3.2. Sphingolipid Metabolism Modulates Melanoma Cell Proliferation and Survival

Transformation of normal melanocytes into melanoma cells is mediated by the activation of growth stimulatory pathways, typically leading to cellular proliferation as well as the inactivation of

apoptotic and tumour suppressor pathways. The RAS-RAF-MEK-ERK pathway is one of the most important signalling pathways involved in melanoma cell growth and survival [49,50]. A constitutive activation of BRAF, mostly due to the substitution of valine by glutamic acid at position 600 (also known as V600E), affects about 50% of melanoma patients [9,51–53] (Figure 2). Therapies targeting the BRAF V600E mutation help advanced melanoma patients live longer [54,55]. Moreover, co-administration of BRAF (vemurafenib) and MEK (cobimetinib) inhibitors improves the progression-free survival [56] and extends the five-year overall survival by ~40% [57]. Unfortunately, most patients, including those who experience an initial tumour regression, exhibit disease progression within 6–8 months following the initiation of targeted therapy [58].

Multiple lines of evidence indicate that some SL-metabolising enzymes regulate melanoma cell proliferation and survival. First, SphK1 expression and activity are induced by ERK1/2 and AKT in numerous mammalian cells [59–61], including melanoma cells [20,21]. Moreover, SphK1 knockdown by siRNA decreased anchorage-dependent and -independent growth of human melanoma cells [20]. Similarly, targeting SphK1 using shRNA in B16F10 [62] or Yumm 1.7 [22] murine melanoma cells reduced tumour growth in syngeneic mice. Accordingly, the SphK1 inhibitor SKI-I, which increases the intracellular ceramide levels and decreases S1P levels in melanoma cells, resulted in a cell cycle arrest between G2/M and S phases as well as increased apoptotic cell death, caspase-3 activation and nuclear accumulation of cleaved PARP [20]. The intraperitoneal administration of SKI-I in mice harbouring melanoma also decreased tumour growth [20,22]. Consistently, the growth of B16F10 tumours is impaired in SphK1$^{-/-}$ mice as compared to wild-type animals [21].

S1P, which is mainly produced by SphK1 in melanoma cells, conveys oncogenic signals as an intracellular second messenger via a ligation of a family of G-protein coupled receptors (S1P1-5) expressed both on the malignant and their neighbouring cells [63]. We recently demonstrated that the melanoma cell-autonomous survival in response to the BRAF inhibitor vemurafenib is mediated by S1P1 and S1P3 [64].

Moreover, AC, which is expressed at high levels in proliferative melanoma cells, may also contribute to melanoma cell proliferation and survival. Indeed, AC inhibition by siRNA dramatically reduced the number of 501mel melanoma cells, as shown using short-term cell growth and colony formation assays [19]. Similarly, CRISPR/Cas9-mediated AC ablation in A375 melanoma cells blocked G1/S cell cycle progression, promoted senescence and apoptosis, resulting in reduced cell growth. These cells were unable to form spheroids and showed a lower replication rate as well as a decreased in their invasive capacity compared to controls. Mechanistically, AC ablation resulted in the accumulation of the saturated C14-, C16- and C18-ceramides and is accompanied by the down-regulation of MYC, CDK1, CHK1 and AKT [65]. In accordance, the inhibition of AC activity with a chemically stable AC inhibitor, named compound ARN14988, sensitised proliferative melanoma cells to the cytotoxic actions of various anti-tumour agents [18]. In line with these observations, we previously reported that the cytotoxic action of dacarbazine was accompanied with AC proteolysis in human melanoma cells [66]. Of interest, confocal immunofluorescence analyses revealed the nuclear localisation of AC in normal melanocytes, a phenomenon not observed in melanoma cells, suggesting that AC could activate proliferation pathways only in tumour cells [18].

By reducing ceramide levels, AC, in concert with SphK1, favours melanoma cell proliferation. This was confirmed using short-chain C2-ceramide, which was reported to inhibit AKT and ERK activation as well as proliferation in Malme-3M melanoma cells [67]. In addition, the GCS inhibitor PDMP, which increases intracellular C16-ceramide levels, inhibited cell proliferation, migration and invasion of WM35 and WM451 human melanoma cells. The effect of PDMP was associated with the inhibition of key enzymes from the glycolysis pathway including the pyruvate kinase, hexokinase and lactic acid dehydrogenase. Strikingly, the treatment of melanoma cells with exogenous C16-ceramide neither altered melanoma cell growth nor migration and invasion. In contrast, exogenous C16-ceramide was shown to promote glycolysis. This opposite effect could be explained by the reduction of endogenous C16-ceramide levels, which was induced by exogenous C16-ceramide treatment [14].

Finally, GCS, which catalyses the first committed step in the synthesis of most glycosphingolipids, i.e., the transfer of glucose to ceramide to form GlcCer, is also able to control tumorigenic capability of melanoma cells. Indeed, antisense oligonucleotide targeting the Ugcg gene, encoding GCS, reduced tumorigenicity of MEB4 murine melanoma cells [68]. Similarly, the inhibitor of GCS, OGT2378, inhibited MEB4 melanoma tumour growth in a syngeneic, orthotopic murine model [69]. In agreement with these findings, we previously showed that overexpression of GBA2 in melanoma cells, an enzyme able to degrade GlcCer into ceramide, reduced tumour cell growth both in vitro and in vivo by triggering ER stress-induced apoptosis [70]. Of note, GBA2 gene is downregulated in melanoma cells as compared to melanocytes [70]. Altogether, these observations demonstrate that the transformation of ceramide into GlcCer facilitates melanoma cell proliferation.

Interestingly, sialic acid-containing glycosphingolipids, i.e., gangliosides, can also regulate melanoma cell proliferation. First, treatment of SKMEL-28 melanoma cells with the anti-GD3 antibody R24 reduced their growth in vitro and decreased their tumorigenicity when injected in immunodeficient mice [71]. Second, Furukawa et al. demonstrated that GD3 increased the proliferation of GD3 synthase-overexpressing melanoma cells [72]. In these settings, GD3 mediated the convergence of several pro-tumoral signals, including those induced by hepatocyte growth factor (HGF) and the receptor tyrosine kinase c-MET, notably promoting cell proliferation [73].

Altogether, these data illustrate that SL metabolism alterations, which redirect ceramide metabolism towards S1P or GD3 production, can promote melanoma cell proliferation and survival in response to drugs.

4. Role of the Sphingolipid Metabolism in Melanoma Progression

4.1. SL Metabolism Regulates Melanoma Cell Adhesion

Cell junctions, which are crucial for the communication between neighbouring cells and with the extracellular environment, can be divided into three major classes: anchoring junctions (including adherens junctions, desmosomes, hemidesmosomes and focal adhesions), tight junctions and gap junctions. In the epidermis, cadherins are the major adhesion molecules, especially involved in the composition of desmosomes and adherens junctions [74], whereas integrins are the major component of hemidesmosomes [75]. Among cadherins, E-cadherin mediates the adhesion between melanocytes and keratinocytes allowing keratinocytes to control cell growth and dendricity of melanocytes [76]. E-cadherin expression is lost in melanoma cells during the first steps of tumour progression [77]. Interestingly, when E-cadherin expression is restored, keratinocytes recover control of melanoma cells thus preventing tumour progression [78].

Here, we review studies documenting the role of the SL metabolism in the control of the expression of adhesion molecules as well as melanoma cell adhesion capacity. Previous reports have shown that E-cadherin loss was observed in SphK1-overexpressing cancer cells [79,80]. S1P-induced E-cadherin downregulation could be mediated by S1P2 and S1P3, as shown in alveolar epithelial cells [81] and lung fibroblasts [82]. This phenomenon could be indirect in melanoma cells as the SphK1/S1P pathway is able to stimulate TGF-β1 production [62], which may trans-activate S1P2 and S1P3 [82]. Interestingly, overexpression of S1P2, but not S1P1, in B16F10 melanoma cells resulted in the inhibition of the small GTPase Rac activity as well as tumour progression in mice [83]. Importantly, Rac is crucial to create E-cadherin-dependent cell-cell contacts [84].

Moreover, downregulation of AC in melanoma cells induced E-cadherin loss and, inversely, increased expression of the epithelial-mesenchymal transition (EMT)-associated protein TWIST1, which is in accordance with a more aggressive phenotype [19].

Finally, GD3 was shown to favour the recruitment of integrins through glycolipid-enriched microdomains in GD3 synthase-overexpressing melanoma cells. Under these conditions, melanoma cell adhesion to the extracellular matrix (ECM) was increased [85]. Similarly, Ohmi et al. demonstrated that cell adhesion increased in GD2 synthase-overexpressing melanoma cells as compared control cells [86].

Thus, SL alterations appear to impact on melanoma cell adhesion, particularly through E-cadherin loss, which promotes melanoma progression.

4.2. SL Metabolism as a Determinant of Melanoma Plasticity

To colonise distant organs, tumour cells need, besides losing their cell junctions, to acquire invasive capacities. In skin cancers, EMT plays a key role in this process. This fundamental mechanism allows epithelial cells to gain mesenchymal features, increasing their migration and invasion abilities (for review, see [87]). However, unlike other skin cancers, melanoma does not arise from epithelial cells but from neural crest-derived melanocytes. For this reason, EMT stricto sensu cannot be considered in melanoma progression. Nevertheless, an EMT-like phenomenon has been described, in which melanoma cells can dynamically and reversibly switch between a proliferative and an invasive state; this is known as "phenotype switching". Indeed, the microarray analysis of DNA from different human melanoma cell lines allowed Hoek et al. to determine a transcriptional signature representative of metastatic cell behaviour. The authors indeed demonstrated that MITF is one crucial actor in this switch, particularly in maintaining the proliferative state [88].

MITF represents a melanocytic lineage-specific transcription factor that regulates melanocyte differentiation, function and survival as well as melanoma progression [89]. MITF regulates pigment cell-specific transcription of genes encoding melanogenic enzymes such as TYR, DCT and TYRP1, as well as proteins involved in melanosome formation and maturation such as Melan-A, Premelanosome Protein and G Protein-Coupled Receptor 143. As a matter of fact, MITF expression and activity are modulated by a range of activators and suppressors operating at transcriptional, post-transcriptional and post-translational levels (for review, see [90]). MITF function has been tightly connected to melanoma cell plasticity. It is now well accepted that melanoma cells expressing moderate to high levels of MITF proliferate rapidly and are poorly invasive, whereas melanoma cells characterised by low MITF levels grow more slowly and are more invasive. Thereby, low levels of MITF correlate with a worse prognosis for melanoma patients [19,89,91].

Interestingly, numerous studies showed that the SL metabolism regulates MITF expression. Firstly, A-SMase expression has been shown to induce ERK-mediated MITF degradation by the proteasome. Therefore, the loss of A-SMase observed during melanoma progression accounts for the upregulation of MITF as well as for some of its downstream targets CDK2, Bcl-2 and c-MET [34]. Secondly, AC ablation by the CRISPR-Cas9 technology, which is associated with the accumulation of long-chain saturated ceramides, led to a strong downregulation of MITF expression in human A375 melanoma cells, reducing their ability to form cancer-initiating cells and to undergo self-renewal [65]. Furthermore, exogenous addition of C2-ceramide was shown to reduce MITF expression in human melanocytes [35]. Reciprocally, we demonstrated that MITF expression increased in AC-overexpressing melanoma cells. However, at variance with Lai et al., we observed that melanoma cells expressing AC at high levels displayed a proliferative phenotype as compared to cells with low expression of AC that exhibited high mobility and gain of mesenchymal features [19]. Moreover, using a ChIP-Seq database, we identified AC as a new target of MITF, demonstrating that MITF and AC are part of a positive feedback loop.

SL metabolism could also modulate MITF levels by acting on signalling pathways known to regulate its expression in melanoma cells. For instance, canonical Wnt signalling through the Wnt/β-catenin pathway is a critical activator of MITF expression in melanoma cells [92], and deactivation correlates with a higher metastatic potential [88]. Interestingly, exogenous sphingosine has been shown to reduce nuclear and cytosolic β-catenin expression in SW480 and T84 colon cancer cells [93]. In accordance, pharmacological inhibition of SphK1 with SKI-II was associated to a decreased β-catenin expression in human hepatoma carcinoma [94]. As expected, FTY720, a sphingosine analogue known to inhibit SphK1 [95], led to the reduction of β-catenin as well as MITF expression in melanocytes [96].

Moreover, a switch in EMT-associated transcription factors (EMT-TFs) occurs in melanoma and drives tumour progression. This dynamic network includes Snail, Zeb and Twist families, which are major repressors of epithelial genes, and, conversely, major activators of mesenchymal genes (for

review, see [87]). In particular, a reduced expression of ZEB2 and SNAIL2 in favour of an increased expression in ZEB1 and TWIST1 was linked to E-cadherin loss, increased invasion properties and poor clinical outcomes in human melanoma [97]. The EMT-TFs switch was associated with a reduction of MITF expression. Indeed, ZEB1 and TWIST1 have been shown to downregulate MITF whereas SNAIL2 or ZEB2 induce MITF expression, demonstrating that these EMT-TFs act as key players in melanoma phenotype switching.

Recent studies identified a strong connection between SL metabolism and EMT-TFs. Indeed, reduced expression of CerS6, which decreased the levels of intracellular C16-ceramide, was associated with an increased expression of SNAIL2 in SW480 colon cancer cells [98]. Hence, by controlling the expression of EMT-TFs or by altering plasma membrane fluidity, C16-ceramide could affect cancer cell motility [99]. Another SL-metabolising enzyme could also account for the effects of ceramide on EMT-TFs. Indeed, SMS2, which produces SM from ceramide, seems to stimulate the expression of mesenchymal markers and enhance migration and invasion of MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. Interestingly, SMS2 expression was higher in metastatic breast cancer than in non-metastatic tumours. Mechanistically, SMS2 was shown to activate the canonical TGFβ/SMAD signalling pathway leading to the expression of its downstream target Snail [100]. In addition, previous studies have demonstrated that some ganglioside-metabolising enzymes are connected with EMT-FTs and gangliosides play a critical role in EMT [101]. For instance, ZEB1 was reported to be a direct regulator of the GM3 synthase gene (St3gal5) in mammary epithelial NM18 cells. ZEB1 also impaired the expression of miR-200a, a microRNA targeting the 3'UTR GM3 synthase mRNA. Knockdown of GM3 synthase partly mimicked the effects of ZEB1 inhibition, leading to increased expression of cell junction components such as E-cadherin as well as intercellular adhesion [102]. Moreover, overexpressing TWIST or SNAIL1 in transformed human mammary epithelial cells enhanced the expression of GD3 synthase [103]. GD3 synthase knockdown reduced breast cancer stem cell-associated properties and completely abrogated tumour formation in vivo. In accordance, other studies have shown that ceramide glycosylation by GCS was enhanced in breast [104] and colon [105] cancer stem cells and GCS inhibition significantly decreased the expression of ZEB1 and β-catenin [105]. Whether GCS, a ganglioside-metabolising enzyme, CerS6 or SMS2 modulates EMT-TFs in melanoma cells remains to be evaluated.

Furthermore, numerous studies have shown that TGF-β is a strong promoter of EMT in many tumours [106,107], including melanoma [88]. TGF-β signalling inhibits MITF expression through PAX3 repression and GLI2 activation. Many studies reported that the SphK1/S1P and the TGF-β signalling are interconnected. Indeed, through its binding to S1P receptors, S1P was shown to promote TGF-β receptor trans-activation leading to Smad phosphorylation and cell migration [108–110]. Additionally, in different cancers including melanoma, S1P was reported to increase TGF-β expression and secretion [62,111,112]. Inversely, TGF-β was able to increase SphK expression and activity, which were essential to control the effects of TGF-β on extracellular matrix remodelling, cell migration and invasion [113,114].

Finally, TEAD transcription factors (TEADs) were identified as key regulators of the invasive state in melanoma [115]. TEADs need coactivators such as YAP and TAZ, which are known effectors of the Hippo pathway. This pathway has been shown to modulate Wnt and TGF-β signalling and confer pro-invasive properties in melanoma [116]. Strikingly, multiple studies have identified S1P as an activator of YAP through S1P2 signalling [117–119]. Similarly, a recent study demonstrated that inhibition of SphK1 using the PF-543 inhibitor could inhibit TGFβ-induced activation of YAP [120]. As anticipated from its close structural similarity with S1P, SPC also regulated the Hippo pathway via S1P2, in a rather unclear manner as it could both inhibit and activate YAP [121].

To summarise, tight connections have been reported between SL metabolism and key players of the phenotype switching in melanoma including transcription factors such as MITF, EMT-TFs, TEADs and fundamental signalling pathways such as Wnt, TGF-β and Hippo. These observations further highlight the importance of the SL metabolism in melanoma progression.

4.3. SL Metabolism as a Major Regulator of Melanoma Aggressiveness

As discussed above, melanoma aggressiveness depends on the balance between its proliferative potential and migratory/invasive properties. S1P was reported either to activate or to inhibit melanoma cell migration depending on S1P receptor subtypes. Indeed, whereas S1P inhibited cell migration, with the concomitant inhibition of Rac and stimulation of RhoA, in S1P2-expressing B16F10 cells, it stimulated cell migration of S1P1-overexpressing cells, demonstrating a receptor subtype-specific action of S1P on melanoma cells [83]. The inhibitory effects of S1P were reversed by the S1P2-selective antagonist JTE013, which stimulated Rac and migration of B16F10 cells overexpressing either S1P1 or S1P3 [122]. Similar results were obtained in B16F10 cells treated with SPC instead of S1P [122].

In addition, AC overexpression in melanoma cells decreased tumour cell motility, whereas AC silencing had the opposite effect, as was observed for MITF [19]. We recently demonstrated that low AC expression was associated to increased FAK phosphorylation and relocation at focal adhesions instead of cytoplasm. This phenomenon led to increased expression of integrin β5 (ITGβ5) and integrin αV (ITGαV), which play a critical roles in the migratory and invasive capacity of cancer cells. As a result, the melanoma invasive behaviour induced by AC inhibition was reduced using an ITGαVβ5 blocking antibody [19].

Another study reported that lung metastases were reduced in A-SMase-deficient mice injected with B16-F10 melanoma cells. Treating B16F10 cells with exogenous A-SMase or C16-ceramide before inoculation restored lung metastatic lesions in A-SMase-deficient mice. Mechanistically, melanoma cells were shown to activate A-SMase in platelets, leading to ceramide production, which favoured the clustering and activation of α5β1 integrins at the surface of melanoma cells and therefore tumour cell adhesion in the lungs [123]. As the expression of melanoma A-SMase negatively correlates with tumour aggressiveness [34], one could speculate that A-SMase expression acts as a key factor that controls melanoma cell invasion and adhesion into the metastatic niches.

Gangliosides also likely contribute to melanoma cell dissemination. As a matter of fact, the level of GM3, which has been described as one of the major gangliosides in melanoma [124], increased in murine metastatic melanoma [125], suggesting a role for GM3 in tumour aggressiveness. Indeed, the addition of GM3 to B16LuF1 melanoma cells, i.e., B16-melanoma cells of lower metastatic potential to lungs, increased their dissemination capacity once injected in mice [126]. Liu et al. also described that de-N-acetyl GM3 (d-GM3), a derivative of ganglioside GM3, was mainly found in metastatic melanomas but not in benign nevi or most primary melanomas. d-GM3 expressing melanoma cells possess increased migratory and invasive capacities as compared to melanoma cells lacking d-GM3. Mechanistically, d-GM3 stimulated MMP-2 expression via the urokinase-like plasminogen activator (uPA) receptor [127].

Some studies indicated that GD3 also stimulates melanoma cell invasion. Indeed, human melanoma GD3-positive cells showed a markedly increased cell invasion potential as compared to GD3-negative cells. The invasive activity induced by GD3 was shown to be mediated by p130Cas or paxillin, two components of the focal adhesion cytoskeleton [72]. More recently, Ohmi et al. compared the effect of GD3 and GD2 on melanoma progression. Using GD3-^{high} or GD2-^{high} melanoma cells, obtained by overexpressing the respective glycosyltransferases involved in their production, they demonstrated that GD2 enhanced the adhesion properties of melanoma cells, while GD3 stimulated their invasive capacities. These findings led the authors to propose that GD2 would rather act at the primary and metastatic sites in order to promote cell proliferation and dissemination, while GD3 would favour melanoma cell invasion in order to reach a metastatic niche [86].

Finally, emerging literature indicates that tumour exosomes actively participate in tumour invasiveness and favour the formation of pre-metastatic niches in various types of cancer, including melanoma [128–130]. Exosomes are small extracellular vesicles (EVs) that originate from the fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane and convey their cargo towards target cells. They carry transmembrane and cytosolic proteins, DNA and small RNAs [131]. In vitro, melanoma-derived exosomes were shown to promote the EMT-like processes in primary melanocytes.

This effect occurred in an autocrine/paracrine fashion and was mediated by the microRNA Let-7i [132]. In mice, B16-F10-derived exosomes demonstrated preferential homing to lymph nodes and facilitated the seeding of intravenously injected parental cells [133]. In particular, Peinado et al. showed that, through the receptor c-MET, B16-F10-derived exosomes can educate bone marrow-derived cells, promoting angiogenesis, vascular leakiness, the growth of primary tumours and metastasis [128].

It is well known that ceramide, generated by the neutral SMase2 (nSMase2) on the cytosolic leaflet of endosomal membranes, is involved in the budding of exosomes [134]. Mechanistically, the cone-shaped structure of ceramide could induce spontaneous negative curvature by creating an area difference between the membrane leaflets [135]. Moreover, a decrease in the activity of nSMase2 induced by the GW4869 compound, resulted in the reduced release of exosomal miRNAs [136]. By controlling exosomal miRNA secretion, nSMase2 is able to promote angiogenesis as well as metastasis [137]. Furthermore, Kajimoto et al. also showed that S1P, produced by SphK2 but not Sphk1, can regulate the cargo content in exosomes [138,139] probably through the Gβγ subunit of Gi proteins coupled with S1P1 [140]. Whether nSMase2- and/or SphK2-dependent exosome formation modulates melanoma progression remains to be investigated.

All these findings clearly establish a close relationship between SL metabolism and melanoma invasion and suggest that SL metabolism could be therapeutically targeted in order to improve the outcome of melanoma patients.

5. Role of SL Metabolism in the Immune Response to Melanoma

Melanoma cells harbour an aberrant antigenic profile, which allows for an anti-tumour immune response [141]. Despite their high immunogenicity, melanoma cells eventually evade the immune system, grow and metastasise [142,143]. A growing body of evidence in the literature indicates that SLs regulate various immune processes. Thus, deciphering the role of SL metabolism in melanoma immune escape is of great clinical interest.

5.1. S1P in Lymphocyte Traffic and Differentiation

Lymphocytes sense S1P concentration via S1P1 [144,145] allowing their egress from the thymus and lymph nodes to peripheral tissues [146]. S1P1 expression is modulated cyclically during lymphocyte traffic, depending on the local S1P concentration: it is downregulated in the blood, upregulated in secondary lymphoid organs (SLO) and downregulated again in the lymph [147]. CD69, an early activation marker on lymphocyte surface, induces S1P1 internalisation and degradation [148], sequestering lymphocytes in SLO [149] and peripheral tissues [150]. S1P1 downregulation is necessary to establish a long-term memory in the skin [151,152] and CD69 is one of the markers (with CD103) for tissue-resident memory cells (TRM) [153], which play a critical role in melanoma immunosurveillance [154–156].

Drouillard et al. proposed that the S1P1/S1P2 ratio dictates the migration of T cells, as S1P2 inhibited the chemo-attraction of peripheral T cells [157]. Sic et al. reported that human B cells also migrate towards S1P in an S1P1-dependent manner that is inhibited by CD69 expression [158]. Interestingly, egress of natural killer (NK) cells from the bone marrow and SLO is mediated by the expression of S1P5 [159,160], which is regulated by T-box transcription factor TBX21 [161]. Increased S1P5 expression as well as downregulation of CXCR4 during NK differentiation is necessary for their egress from the bone marrow [162].

SphK activity and S1P1 expression were shown to mediate differentiation of $CD4^+$ T cells to Th1 cells and inhibit induced Treg (iTreg) generation [163]. In accordance, in T cell-specific S1p1-transgenic mice, S1P1 oriented the differentiation of $CD4^+$ towards the Th1 lineage when antigen-activated. Moreover, S1P1 overexpression impaired the maintenance of Foxp3 expression in naïve TGF-β-treated $CD4^+$ T cells. The differentiation of naïve $CD4^+$ T cells towards Th1 or iTreg appeared to be reciprocal, driven by the S1P1-mTOR axis, and dependent on the SphK activity as demonstrated with the SphK

inhibitors N,N,-dimethylsphingosine (DMS) and SKI. Similarly, $CD4^+$ T cells deficient for Sphk1 showed a lesser Foxp3 expression when cultured with IL-2 and TGF-β [164].

5.2. S1P Impairs the Immune Response in Melanoma

We reported that melanoma SphK1 plays a key role in the recruitment and phenotypic switch of TAM notably promoting their commitment to a pro-tumoral M2-like phenotype [62]. Moreover, we recently showed that high SphK1 expression in melanoma cells was associated with shorter progression-free and overall survivals in melanoma patients treated with anti-PD-1-based immunotherapy. In mice, SphK1 knockdown in melanoma tumours potently reduced the production of a number of immunosuppressive cytokines including TGF-β [22,62], limiting Treg tumour infiltration. Under these conditions, the response of melanoma cells to anti-PD-1 or anti-CTLA-4-based immunotherapy highly increased [22]. Interestingly, Chakraborty et al. also reported that tumour-infiltrating lymphocytes display higher Sphk1 expression as compared to splenocytes in B16-F10-bearing mice [164]. Melanoma antigen-specific T cells deficient for Sphk1 (pMel-SphK1$^{-/-}$ T cells) were shown to maintain a central memory phenotype and have a reduced propensity to differentiate into Treg as compared to wild-type T cells (pMel T cells). Tumour growth was significantly slower upon adoptive transfer of pMel-SphK1$^{-/-}$ T cells, as compared to mice injected with wild-type pMel T cells [164].

Recent findings also show that S1P secretion, via the S1P transporter Spinster Homologue 2 (Spns2), reduced $CD8^+$ T cell function and therefore promoted lung metastasis. Indeed, the deletion of Spns2, either globally or in a lymphatic endothelial cell-specific manner, was associated with an increased ratio of effector T-cells to immunosuppressive Tregs, in the lungs of Spns2-deficient mice intravenously injected with B16F10 or HCmel12 murine melanoma cells. This resulted in a reduced pulmonary metastatic burden as compared to what was observed in wild-type animals [165].

5.3. Ceramide and Its Derivatives in the Immune Response

Several studies have shown that ceramide metabolism could regulate the immune response in different melanoma models. Firstly, A-SMase-deficient B16-F1 melanoma cells engrafted in mice display an inflammatory TME and are infiltrated by high levels MDSCs and Tregs and low levels of DCs. A-SMase overexpression in these cells restores $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells and DCs infiltration while reducing levels of infiltrating MDSCs and Tregs, thereby reducing tumour growth [166].

Secondly, KRN7000, a synthetic alpha-galactosylceramide [167], showed promising results in enhancing NK, NKT, $CD8^+$ T cells and M1 infiltration in the syngeneic murine B16 metastatic melanoma model [168] but further investigation needs to be conducted.

Thirdly, it was recently reported that liposomes enriched in C2-ceramide were shown to reprogram the immune TME in a PKCζ-dependent manner in B16-F10-bearing mice. Under these conditions, TAMs shifted towards an M1 phenotype and $CD8^+$ and Th1 cells infiltration was enhanced while intra-tumour MDSCs and Tregs levels were reduced [169].

Finally, gangliosides also represent attractive targets for immunotherapies as they are abundant in melanoma cells [24] and recognised by NKT cells [170]. GM2 [171] and N-glycolyl GM3 (NGcGM3), in particular, have been the main gangliosides used as targets for the development of anti-melanoma antibodies and vaccine [172,173]. In addition, gangliosides are also known to be shed by melanoma cells [174,175] and exert a pro-apoptotic effect on DCs [176,177]. 3F8, a monoclonal anti-GD2 mAb, demonstrated anti-proliferative and pro-apoptotic activity in human melanoma cell lines [178] but clinical studies focused on neuroblastoma [179] and medulloblastoma [180] patients. More recently, GD2 has been considered as a promising target for the treatment of melanoma patients using either CAR-T cell therapy [181] or the immunocytokine hu14.18-IL2, an anti-GD2 humanised mAb linked to two molecules of IL-2 and administered to patients with recurrent resectable stage III or IV melanoma [182].

5.4. Melanoma-Derived Exosomes Are Vectors of Immunosuppression

As mentioned above, Trajkovic et al. showed that the production of ceramide by nSMase 2 was part of the mechanisms involved in exosome budding [134]. In addition to favouring progression and metastasis, melanoma-derived small extracellular vesicles, often defined as exosomes, also carry immunomodulatory molecules that impair anti-tumour immune responses. In vitro, exosomes released from B16F0 murine melanoma cells inhibited the proliferation of T cells by delivering PTPN11(SHP-2) mRNA and protein [183]. B16F10-derived exosomes can also activate the mitochondrial apoptotic pathway of $CD4^+$ T cells in vitro and in vivo, thereby increasing tumour growth and reducing T cell infiltration [184]. The authors proposed that the miRNA cargo of exosomes (e.g., miR-690) inhibited the expression of anti-apoptotic proteins in $CD4^+$ T cells. In addition, small EVs produced by A375 human melanoma cells were shown to be able to reduce MHC class I molecules to the cell surface of primary human monocytes and THP-1 cells and downregulate the expression of endogenous MHC class I and II molecules in DCs [185]. Exosomes from metastatic melanoma-derived cell lines inhibited TCR signalling and cytokines secretion in $CD8^+$ T cells by transferring an array of miRNA cargo [186]. Moreover, tumour-derived exosomes harvested from melanoma patients' plasma were shown to induce the apoptosis, inhibit proliferation and decrease the activation of $CD8^+$ T cells. They were also able to downregulate NKG2D expression on NK cells [187]. In metastatic melanoma patients, circulating exosomal PD-L1 suppressed $CD8^+$ T cell activity. The authors reported that the pre-treatment level of circulating exosomal PD-L1 was a better predictor of clinical response to anti-PD-1 therapy than total circulating PD-L1 [188]. Importantly, Poggio et al. showed that Pdl1 knockout or exosome depletion by knocking out Smpd3, the gene encoding nSMase2, was sufficient to restore the anti-tumour immune response and to induce an efficient anti-tumour immune-memory response in the murine TRAMP-C2 prostate cancer model [189].

The relationship between SL metabolism and exosome-mediated immunosuppression in melanoma is not well understood, yet it could be a major mechanism of resistance to immunotherapy and thus deserves further investigation.

6. Potential Therapeutic Strategies for Melanoma Patients

Historically, when tumour resection was not possible or failed, chemotherapy was used to treat melanoma. dacarbazine (DTIC) has been approved as first-line treatment for advanced-stage melanoma and has remained for more than 30 years the standard chemotherapy despite no clear overall survival benefits [190–192].

The identification of melanoma driven mutations such as BRAF V600E allowed for a real breakthrough in the treatment of patients with metastatic melanoma. The emergence of BRAF targeted agents such as vemurafenib [54] and dabrafenib [55] allowed tremendous progresses in the field of personalised medicine and demonstrated survival benefits in metastatic melanoma patients as compared to dacarbazine-treated patients. Subsequently, the MEK inhibitor was also approved as treatment for this pathology as it showed survival benefits for patients displaying the BRAF V600E mutation [193]. Combination therapy using BRAF and MEK inhibitors such as cobimetinib [56] is nowadays one of the first line treatment for patients with BRAF V600E metastatic melanoma. This treatment results in higher rates as well as extended duration of response and decreases the cutaneous toxicities observed with the BRAF inhibitor monotherapy. Unfortunately, such therapeutic approaches remain constrained by the inevitable emergence of resistance to single-pathway blockade [194].

Immune checkpoint blockade (ICB) was the first therapeutic strategy to provide sustained responses and survival for advanced melanoma patients, even after treatment discontinuation [195–197]. Administering monoclonal antibodies targeting the immune checkpoint PD-1, alone or in combination with anti-CTLA-4 blocking antibodies is, to date, the standard of care for advanced melanoma patients. Independently of BRAF mutation status, patients treated with the anti-PD-1 and anti-CTLA-4 combo achieve at five years a progression-free survival and an overall survival of 36% and 52%, respectively [198]. Unfortunately, half of the patients do not respond or develop early resistance to ICB

and exhibit severe immune-related adverse events (IRAE) [199]. Although treatment discontinuation due to adverse events seems not to affect the outcome for patients treated with ICB combination therapy [198], IRAEs tend to be associated with a better outcome for patients treated with anti-PD1 monotherapy [200].

Targeted therapies and ICB have deeply changed therapeutic management of patients with metastatic melanoma but all these therapeutic approaches still need improvement. Understanding the mechanisms that underlie resistance to these treatments is of utmost importance to improve the outcome of melanoma patients.

Here, we review some studies, which identified alterations in the SL metabolism as a cause of melanoma resistance to treatment (Table 2) and other studies using SL-related molecules as monotherapy or combined therapy to fight melanoma (Table 3).

Table 2. SL-metabolising enzymes regulate the response of melanoma to therapy.

Targeted SL-Metabolising Enzyme	Melanoma Cells	Experimental Strategy	Treatment	Effects on Drug Sensitivity	Refs
A-SMase	B16-W6_pSIL10	shRNA	Cisplatin (chemotherapy)	Low A-SMase is associated with reduced mTOR-related autophagy and resistance to cisplatin	[201]
AC	A375	AC overexpression	Dacarbazine (chemotherapy)	AC overexpression confers resistance to dacarbazine	[66]
AC	G361 A375	ARN14988 ARN398 (AC inhibitor)	5-FU (chemotherapy)	AC inhibition sensitises G361 cells (proliferative phenotype) but not A375 cells (invasive phenotype) to chemotherapeutic drugs	[18]
SphK1	SK-Mel-28 A375	FTY720	Cisplatin (chemotherapy)	SK1 inhibition increases cisplatin-induced apoptosis through a downregulation of the PI3K/AKT/mTOR pathway and decreases EGFR expression	[202]
SphK1	UACC 903	siRNA	Staurosporine (Apoptosis inducing agent)	Downregulation of Sphk1 sensitises cells to staurosporine-induced apoptosis through AKT inhibition, and G0/G1 phase cell cycle arrest	[20]
SphK1	A375 (overexpression) Mel-2a (downregulation)	SphK1 overexpression or downregulation	Doxorubicin (chemotherapy)	Sphk1 overexpression induces resistance to doxorubicin-induced apoptosis whereas its downregulation by siRNA increases melanoma cell sensitivity to the treatment	[203]
SphK1	WM115 SK-Mel-28	FTY720	Vemurafenib (BRAF inhibitor)	SK1 inhibition increases vemurafenib-induced apoptosis	[204]
SphK1	WM9	SKI-I	Vemurafenib (BRAF inhibitor)	Sphk1 inhibition blocks BRAFi-resistant melanoma cell growth by reducing MITF and Bcl-2 expression	[64]
SphK1	B16-F10	PF-543	ICB Adoptive transfer of melanoma antigen-specific T cells	Sphk1 inhibition in T cells maintains Tcm phenotype, reduces Treg induction and synergises with anti-PD1 treatment	[164]

Table 2. *Cont.*

Targeted SL-Metabolising Enzyme	Melanoma Cells	Experimental Strategy	Treatment	Effects on Drug Sensitivity	Refs
SphK1	Yumm 1.7	shRNA	ICB	SphK1 downregulation enhances ICB therapy efficacy by reducing Treg infiltration	[22]
GCS	B16	PDMP	Genistein (Apoptosis inducing agent)	Ceramide accumulation enhances genistein-induced apoptosis and growth inhibition through JNK activation and AKT inhibition	[205]

Table 3. SL-related molecules used therapy in melanoma.

SL-Related Treatment	Models	Associated Drug	Effects	Refs
Nanoliposomal ceramide	UACC 903 cells 1205 Lu cells Xenografts in nude mice	Sorafenib	Inhibition of melanoma cell growth by targeting both PI3K and MAPK signalling	[206]
Nanoliposomal ceramide	1205 Lu cells In vitro experiments	None	Reduction of integrin affinity and inhibition of melanoma cell migration through PI3K and PKCζ tumour-suppressive activities	[207]
KRN7000	B16 melanoma cell graft intravenously injected in mice	None	Increase of lifespan of mice	[208]
OGT2378 (GCS inhibitor)	B16 derived MEB4 melanoma cell graft in female C57BL/6 mice	None	Inhibition of tumour growth and reduction of established tumours	[69]
Intra-muscular GM3/VSSP vaccine	Phase I clinical trial: 26 patients with advanced (stage III and IV) melanoma	Adjuvant Montanide Isa 51	GM3/VSSP vaccine induces anti-GM3 IgM response in 44% of patients. Serum reactivity against melanoma cells and tumour biopsies is reported	[209]
L612-HuMAb (Human monoclonal antibody that binds to GM3)	Phase I clinical trial: 9 patients with advanced (stage IV) melanoma	None	L612 HuMAb induces significant antitumour activity in melanoma patients	[210]

7. Conclusions

As developed in this review, changes in SL metabolism that contribute to melanomagenesis, tumour progression and therapeutic resistance are multiple (Figure 4).

The action of sphingolipids (via the enzymes that control their metabolism, and transporters) is likely mediated by modifications in key regulatory processes including the phenotypic switch and EV-mediated cell-cell communication. Interestingly, these metabolic alterations could be envisioned as potential biomarkers and be exploited to better characterise tumour progression in melanoma patients. As a matter of fact, we identified that a reduced expression of SMS1 was significantly associated with a worse prognosis in metastatic melanoma [29]. AC was also identified as a potential biomarker for the prognosis of melanoma [211]. Moreover, we recently demonstrated that human invasive melanoma cells had lower AC levels and activity than proliferative melanoma cells [19]. In accordance, high AC expression was observed in node-negative stage II melanomas [18].

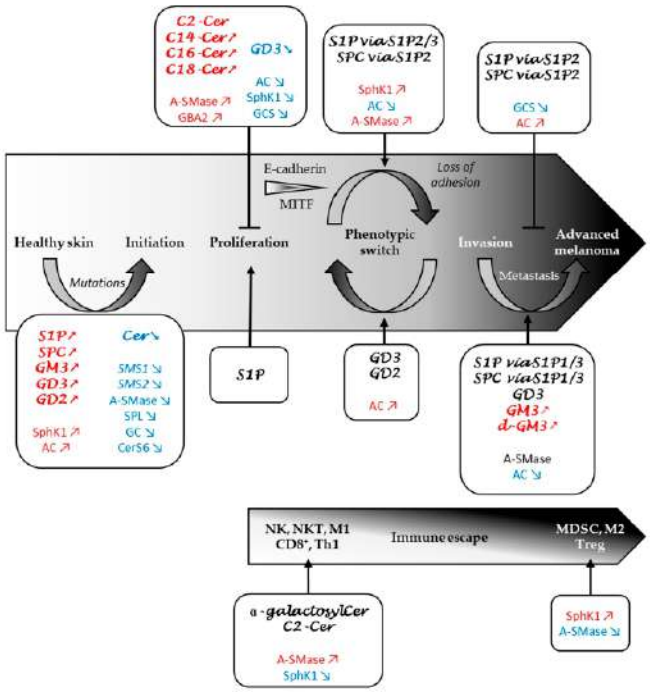


Figure 4. Role of sphingolipid metabolism in melanoma progression and immune response. SL metabolites and SL-metabolising enzymes whose levels and expression are increased, decreased or implicated are marked in red, blue or black, respectively. AC, acid ceramidase; $CD8^+$, $CD8^+$ T cells; Cer, ceramide; CerS, ceramide synthase; GC, glucosylceramidase; GCS, glucosylceramide synthase; M1, M1 macrophages; M2, M2 macrophages; MDSC, myeloid-derived suppressor cells; NK, natural killer cells; NKT, natural killer T cells; S1P, sphingosine 1-phosphate; S1P1/2/3, S1P receptor type 1/2/3; SMases, sphingomyelinases; SMS, sphingomyelin synthase; SPC, sphingosylphosphorylcholine; SphK, sphingosine kinase; SPL, S1P lyase; Th1, Th1 $CD4^+$ T cells; Treg, tegulatory T cells.

It is also interesting to note that a strong association between increased serum levels of gangliosides and high Breslow index or high Clark level as well as the presence of ulceration has been reported in melanoma patients, suggesting that circulating gangliosides may serve as potential markers for melanoma staging [212].

Monitoring the expression of SL-metabolising enzymes as well as SL levels could also be used to track the response to therapy in melanoma. Indeed, we previously showed that AC expression was associated to the response of melanoma cells to dacarbazine. Whereas overexpression of AC conferred resistance to dacarbazine, AC downregulation sensitised tumour cells to the drug [66]. DTIC triggered AC degradation and this effect was accompanied with an increased ceramide/S1P ratio. Our recent results also reveal that a distinct SL profile, i.e., a tendency for increased very long-chain ceramide species, was observed in the plasma of patients with melanoma who achieve a response to a BRAF-targeted therapy as compared with patients with progressive disease [64]. Finally, we recently discovered that melanoma patients with low SphK1 expression had significantly longer progression-free survival and overall survival than those with high SphK1 expression and patients with high SphK1 expression mostly failed to respond to anti-PD-1 therapy. These findings support the

hypothesis that SphK1 expression represents a potential biomarker to predict tumour progression and resistance to anti-PD-1 in metastatic melanoma patients [22].

It would now be of great interest to evaluate the possible association between these SL metabolic alterations and the mutation status of oncogenes such as BRAF or NRAS as well as immune responses in metastatic melanoma patients. This will be performed in patients treated with anti-PD-1 in combination or not with anti-CTLA-4 in a prospective clinical trial (IMMUSPHINX: NCT03627026) we are currently conducting in our institute.

Funding: This research was funded by INSERM, Paul Sabatier University, Fondation Association pour la Recherche sur le Cancer [B. Ségui (R19179BB) and N. Andrieu-Abadie (R18167BB)], Société Française de Dermatologie [N. Andrieu-Abadie (R18126BB)], Fondation Toulouse Cancer Santé [B. Ségui (R19225BB)] and Institut National du Cancer [N. Andrieu-Abadie (R19243BP)]. The work also received funding from the Transcan-2 Research Program, which is a transnational R&D program jointly funded by national funding organisations within the framework of the ERA-NET Transcan-2 [N. Andrieu-Abadie (TRANS201601250)]. The APC was funded by Fondation Association pour la Recherche sur le Cancer [N. Andrieu-Abadie (R18167BB)]. L.C. is a recipient of a fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Gershenwald, J.E.; Guy, G.P. Stemming the Rising Incidence of Melanoma: Calling Prevention to Action. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2016**, *108*. [CrossRef]
2. Zhu, Z.; Liu, W.; Gotlieb, V. The rapidly evolving therapies for advanced melanoma—Towards immunotherapy, molecular targeted therapy, and beyond. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2016**, *99*, 91–99. [CrossRef] [PubMed]
3. Crowson, A.N.; Magro, C.M.; Mihm, M.C. Prognosticators of melanoma, the melanoma report, and the sentinel lymph node. *Mod. Pathol.* **2006**, *19*, S71–S87. [CrossRef] [PubMed]
4. Shain, A.H.; Bastian, B.C. From melanocytes to melanomas. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 345–358. [CrossRef]
5. Chang, A.E.; Karnell, L.H.; Menck, H.R. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: A summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer* **1998**, *83*, 1664–1678. [CrossRef]
6. Herlyn, M.; Thurin, J.; Balaban, G.; Bennicelli, J.L.; Bondi, E.; Guerry, D.; Nowell, P.; Clark, W.H.; Koprowski, H. Characteristics of Cultured Human Melanocytes Isolated from Different Stages of Tumor Progression. *Cancer Res.* **1985**, *45*, 8.
7. Liu, J.; Fukunaga-Kalabis, M.; Li, L.; Herlyn, M. Developmental pathways activated in melanocytes and melanoma. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *563*, 13–21. [CrossRef]
8. Hsu, M.-Y.; Meier, F.; Herlyn, M. Melanoma development and progression: A conspiracy between tumor and host. *Differentiation* **2002**, *70*, 522–536. [CrossRef]
9. Davies, H.; Bignell, G.R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M.J.; Bottomley, W.; et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **2002**, *417*, 949–954. [CrossRef]
10. Akbani, R.; Akdemir, K.C.; Aksoy, B.A.; Albert, M.; Ally, A.; Amin, S.B.; Arachchi, H.; Arora, A.; Auman, J.T.; Ayala, B.; et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* **2015**, *161*, 1681–1696. [CrossRef]
11. Hodis, E.; Watson, I.R.; Kryukov, G.V.; Arold, S.T.; Imielinski, M.; Theurillat, J.-P.; Nickerson, E.; Auclair, D.; Li, L.; Place, C.; et al. A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. *Cell* **2012**, *150*, 251–263. [CrossRef] [PubMed]
12. Lian, C.G.; Murphy, G. The Genetic Evolution of Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 993–996. [CrossRef]
13. Abildgaard, C.; Guldberg, P. Molecular drivers of cellular metabolic reprogramming in melanoma. *Trends Mol. Med.* **2015**, *21*, 164–171. [CrossRef] [PubMed]
14. Liu, R.; Cao, K.; Tang, Y.; Liu, J.; Li, J.; Chen, J.; Wang, S.; Chen, Z.; Zhou, J. C16:0 ceramide effect on melanoma malignant behavior and glycolysis depends on its intracellular or exogenous location. *Am. J. Transl. Res.* **2020**, *12*, 1123–1135. [PubMed]
15. Borodzicz, S.; Rudnicka, L.; Mirowska-Guzel, D.; Cudnoch-Jedrzejewska, A. The role of epidermal sphingolipids in dermatologic diseases. *Lipids Health Dis.* **2016**, *15*, 13. [CrossRef]

16. Garandeau, D.; Mrad, M.; Levade, T.; Perrotta, C.; Andrieu-Abadie, N.; Diab-Assaf, M. Dysregulation of Sphingolipid Metabolism in Melanoma: Roles in Pigmentation, Cell Survival and Tumor Progression. In *Bioactive Sphingolipids in Cancer Biology and Therapy*; Hannun, Y.A., Luberto, C., Mao, C., Obeid, L.M., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; pp. 123–139. ISBN 978-3-319-20749-0.
17. Tang, Y.; Cao, K.; Wang, Q.; Chen, J.; Liu, R.; Wang, S.; Zhou, J.; Xie, H. Silencing of CerS6 increases the invasion and glycolysis of melanoma WM35, WM451 and SK28 cell lines via increased GLUT1-induced downregulation of WNT5A. *Oncol. Rep.* **2016**, *35*, 2907–2915. [CrossRef]
18. Realini, N.; Palese, F.; Pizzirani, D.; Pontis, S.; Basit, A.; Bach, A.; Ganesan, A.; Piomelli, D. Acid Ceramidase in Melanoma: EXPRESSION, LOCALIZATION, AND EFFECTS OF PHARMACOLOGICAL INHIBITION. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 2422–2434. [CrossRef]
19. Leclerc, J.; Garandeau, D.; Pandiani, C.; Gaudel, C.; Bille, K.; Nottet, N.; Garcia, V.; Colosetti, P.; Pagnotta, S.; Bahadoran, P.; et al. Lysosomal acid ceramidase ASAH1 controls the transition between invasive and proliferative phenotype in melanoma cells. *Oncogene* **2019**, *38*, 1282–1295. [CrossRef]
20. Madhunapantula, S.V.; Hengst, J.; Gowda, R.; Fox, T.E.; Yun, J.K.; Robertson, G.P. Targeting sphingosine kinase-1 to inhibit melanoma: Targeting SPHK1 in melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2012**, *25*, 259–274. [CrossRef]
21. Albinet, V.; Bats, M.-L.; Huwiler, A.; Rochaix, P.; Chevreau, C.; Ségui, B.; Levade, T.; Andrieu-Abadie, N. Dual role of sphingosine kinase-1 in promoting the differentiation of dermal fibroblasts and the dissemination of melanoma cells. *Oncogene* **2014**, *33*, 3364–3373. [CrossRef]
22. Imbert, C.; Montfort, A.; Fraisse, M.; Marcheteau, E.; Gilhodes, J.; Martin, E.; Bertrand, F.; Marcellin, M.; Burlet-Schiltz, O.; Peredo, A.G.d.; et al. Resistance of melanoma to immune checkpoint inhibitors is overcome by targeting the sphingosine kinase-1. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 437. [CrossRef] [PubMed]
23. Colie, S.; Van Veldhoven, P.P.; Kedjouar, B.; Bedia, C.; Albinet, V.; Sorli, S.-C.; Garcia, V.; Djavaheri-Mergny, M.; Bauvy, C.; Codogno, P.; et al. Disruption of Sphingosine 1-Phosphate Lyase Confers Resistance to Chemotherapy and Promotes Oncogenesis through Bcl-2/Bcl-xL Upregulation. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 9346–9353. [CrossRef] [PubMed]
24. Portoukalian, J.; Zwingelstein, G.; Doré, J.F. Lipid composition of human malignant melanoma tumors at various levels of malignant growth. *Eur. J. Biochem.* **1979**, *94*, 19–23. [CrossRef] [PubMed]
25. Loganzo, F.; Dosik, J.S.; Zhao, Y.; Vidal, M.J.; Nanus, D.M.; Sudol, M.; Albino, A.P. Elevated expression of protein tyrosine kinase c-Yes, but not c-Src, in human malignant melanoma. *Oncogene* **1993**, *8*, 2637–2644. [PubMed]
26. Hamamura, K.; Tsuji, M.; Hotta, H.; Ohkawa, Y.; Takahashi, M.; Shibuya, H.; Nakashima, H.; Yamauchi, Y.; Hashimoto, N.; Hattori, H.; et al. Functional Activation of Src Family Kinase Yes Protein Is Essential for the Enhanced Malignant Properties of Human Melanoma Cells Expressing Ganglioside GD3. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 18526–18537. [CrossRef] [PubMed]
27. Huitema, K.; van den Dikkenberg, J.; Brouwers, J.F.H.M.; Holthuis, J.C.M. Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J.* **2004**, *23*, 33–44. [CrossRef]
28. Yamaoka, S.; Miyaji, M.; Kitano, T.; Umehara, H.; Okazaki, T. Expression Cloning of a Human cDNA Restoring Sphingomyelin Synthesis and Cell Growth in Sphingomyelin Synthase-defective Lymphoid Cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 18688–18693. [CrossRef]
29. Bilal, F.; Montfort, A.; Gilhodes, J.; Garcia, V.; Riond, J.; Carpentier, S.; Filleron, T.; Colacios, C.; Levade, T.; Daher, A.; et al. Sphingomyelin Synthase 1 (SMS1) Downregulation Is Associated With Sphingolipid Reprogramming and a Worse Prognosis in Melanoma. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 443. [CrossRef]
30. Higuchi, K.; Kawashima, M.; Ichikawa, Y.; Imokawa, G. Sphingosylphosphorylcholine is a Melanogenic Stimulator for Human Melanocytes. *Pigment Cell Res.* **2003**, *16*, 670–678. [CrossRef]
31. Kim, D.-S.; Park, S.-H.; Kwon, S.-B.; Park, E.-S.; Huh, C.-H.; Youn, S.-W.; Park, K.-C. Sphingosylphosphorylcholine-induced ERK activation inhibits melanin synthesis in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* **2006**, *19*, 146–153. [CrossRef]
32. Jeong, H.-S.; Lee, S.H.; Yun, H.-Y.; Baek, K.J.; Kwon, N.S.; Park, K.-C.; Kim, D.-S. Involvement of mTOR signaling in sphingosylphosphorylcholine-induced hypopigmentation effects. *J. Biomed. Sci.* **2011**, *18*, 55. [CrossRef] [PubMed]
33. Jeong, H.-S.; Park, K.-C.; Kim, D.-S. PP2A and DUSP6 are involved in sphingosylphosphorylcholine-induced hypopigmentation. *Mol. Cell. Biochem.* **2012**, *367*, 43–49. [CrossRef]

34. Bizzozero, L.; Cazzato, D.; Cervia, D.; Assi, E.; Simbari, F.; Pagni, F.; De Palma, C.; Monno, A.; Verdelli, C.; Querini, P.R.; et al. Acid sphingomyelinase determines melanoma progression and metastatic behaviour via the microphtalmia-associated transcription factor signalling pathway. *Cell Death Differ.* **2014**, *21*, 507–520. [CrossRef] [PubMed]
35. Kim, D.-S.; Kim, S.-Y.; Chung, J.-H.; Kim, K.-H.; Eun, H.-C.; Park, K.-C. Delayed ERK activation by ceramide reduces melanin synthesis in human melanocytes. *Cell. Signal.* **2002**, *14*, 779–785. [CrossRef]
36. Amos, C.I.; Wang, L.-E.; Lee, J.E.; Gershenwald, J.E.; Chen, W.V.; Fang, S.; Kosoy, R.; Zhang, M.; Qureshi, A.A.; Vattathil, S.; et al. Genome-wide association study identifies novel loci predisposing to cutaneous melanoma. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 5012–5023. [CrossRef]
37. Astudillo, L.; Therville, N.; Colacios, C.; Ségui, B.; Andrieu-Abadie, N.; Levade, T. Glucosylceramidases and malignancies in mammals. *Biochimie* **2016**, *125*, 267–280. [CrossRef]
38. Dubot, P.; Astudillo, L.; Therville, N.; Sabourdy, F.; Stirnemann, J.; Levade, T.; Andrieu-Abadie, N. Are Glucosylceramide-Related Sphingolipids Involved in the Increased Risk for Cancer in Gaucher Disease Patients? Review and Hypotheses. *Cancers* **2020**, *12*, 475. [CrossRef]
39. Ferraz, M.J.; Marques, A.R.A.; Appelman, M.D.; Verhoek, M.; Strijland, A.; Mirzaian, M.; Scheij, S.; Ouairy, C.M.; Lahav, D.; Wisse, P.; et al. Lysosomal glycosphingolipid catabolism by acid ceramidase: Formation of glycosphingoid bases during deficiency of glycosidases. *FEBS Lett.* **2016**, *590*, 716–725. [CrossRef]
40. Flanagan, J.; Ranes, B.; Brignol, N.; Hamler, R.; Clark, S. The origins of glucosylsphingosine in Gaucher disease. *Mol. Genet. Metab.* **2013**, *108*, S40–S41. [CrossRef]
41. Lai, M.; La Rocca, V.; Amato, R.; Freer, G.; Pistello, M. Sphingolipid/Ceramide Pathways and Autophagy in the Onset and Progression of Melanoma: Novel Therapeutic Targets and Opportunities. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3436. [CrossRef]
42. Jiang, W.; Ogretmen, B. Autophagy paradox and ceramide. *Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Cell Biol. Lipids* **2014**, *1841*, 783–792. [CrossRef] [PubMed]
43. Sun, Y.; Liou, B.; Ran, H.; Skelton, M.R.; Williams, M.T.; Vorhees, C.V.; Kitatani, K.; Hannun, Y.A.; Witte, D.P.; Xu, Y.-H.; et al. Neuronopathic Gaucher disease in the mouse: Viable combined selective saposin C deficiency and mutant glucocerebrosidase (V394L) mice with glucosylsphingosine and glucosylceramide accumulation and progressive neurological deficits. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19*, 1088–1097. [CrossRef] [PubMed]
44. Kinghorn, K.J.; Grönke, S.; Castillo-Quan, J.I.; Woodling, N.S.; Li, L.; Sirka, E.; Gegg, M.; Mills, K.; Hardy, J.; Bjedov, I.; et al. A Drosophila Model of Neuronopathic Gaucher Disease Demonstrates Lysosomal-Autophagic Defects and Altered mTOR Signalling and Is Functionally Rescued by Rapamycin. *J. Neurosci.* **2016**, *36*, 11654–11670. [CrossRef] [PubMed]
45. Panicker, L.M.; Miller, D.; Park, T.S.; Patel, B.; Azevedo, J.L.; Awad, O.; Masood, M.A.; Veenstra, T.D.; Goldin, E.; Stubblefield, B.K.; et al. Induced pluripotent stem cell model recapitulates pathologic hallmarks of Gaucher disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 18054–18059. [CrossRef]
46. Brown, R.A.; Voit, A.; Srikanth, M.P.; Thayer, J.A.; Kingsbury, T.J.; Jacobson, M.A.; Lipinski, M.M.; Feldman, R.A.; Awad, O. mTOR hyperactivity mediates lysosomal dysfunction in Gaucher's disease iPSC-neuronal cells. *Dis. Model. Mech.* **2019**, *12*, dmm038596. [CrossRef]
47. Pópulo, H.; Soares, P.; Faustino, A.; Rocha, A.S.; Silva, P.; Azevedo, F.; Lopes, J.M. mTOR pathway activation in cutaneous melanoma is associated with poorer prognosis characteristics: Letter to the Editor. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2011**, *24*, 254–257. [CrossRef]
48. Li, S.; Song, Y.; Quach, C.; Guo, H.; Jang, G.-B.; Maazi, H.; Zhao, S.; Sands, N.A.; Liu, Q.; In, G.K.; et al. Transcriptional regulation of autophagy-lysosomal function in BRAF-driven melanoma progression and chemoresistance. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1693. [CrossRef]
49. Dhillon, A.S.; Hagan, S.; Rath, O.; Kolch, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **2007**, *26*, 3279–3290. [CrossRef]
50. Smalley, K.S.M. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *Int. J. Cancer* **2003**, *104*, 527–532. [CrossRef]
51. Gorden, A.; Osman, I.; Gai, W.; He, D.; Huang, W.; Davidson, A.; Houghton, A.N.; Busam, K.; Polsky, D. Analysis of BRAF and N-RAS mutations in metastatic melanoma tissues. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 3955–3957.
52. Wellbrock, C.; Karasarides, M.; Marais, R. The RAF proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 875–885. [CrossRef] [PubMed]

53. Curtin, J.A.; Patel, H.N.; Cho, K.-H.; LeBoit, P.E. Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *13*. [CrossRef] [PubMed]
54. Chapman, P.B.; Hauschild, A.; Robert, C.; Haanen, J.B.; Ascierto, P.; Larkin, J.; Dummer, R.; Garbe, C.; Testori, A.; Maio, M.; et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 2507–2516. [CrossRef] [PubMed]
55. Hauschild, A.; Grob, J.-J.; Demidov, L.V.; Jouary, T.; Gutzmer, R.; Millward, M.; Rutkowski, P.; Blank, C.U.; Miller, W.H.; Kaempgen, E.; et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: A multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* **2012**, *380*, 358–365. [CrossRef]
56. Larkin, J.; Ascierto, P.A.; Dréno, B.; Atkinson, V.; Liszkay, G.; Maio, M.; Mandalà, M.; Demidov, L.; Stroyakovskiy, D.; Thomas, L.; et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 1867–1876. [CrossRef] [PubMed]
57. Ribas, A.; Daud, A.; Pavlick, A.C.; Gonzalez, R.; Lewis, K.D.; Hamid, O.; Gajewski, T.F.; Puzanov, I.; Wongchenko, M.; Rooney, I.; et al. Extended 5-Year Follow-up Results of a Phase Ib Study (BRIM7) of Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF -Mutant Melanoma. *Clin. Cancer Res.* **2020**, *26*, 46–53. [CrossRef]
58. Patel, H.; Yacoub, N.; Mishra, R.; White, A.; Yuan, L.; Alanazi, S.; Garrett, J.T. Current Advances in the Treatment of BRAF-Mutant Melanoma. *Cancers* **2020**, *12*, 482. [CrossRef]
59. Pitson, S.M.; Xia, P.; Leclercq, T.M.; Moretti, P.A.B.; Zebol, J.R.; Lynn, H.E.; Wattenberg, B.W.; Vadas, M.A. Phosphorylation-dependent translocation of sphingosine kinase to the plasma membrane drives its oncogenic signalling. *J. Exp. Med.* **2005**, *201*, 49–54. [CrossRef]
60. Leclercq, T.; Pitson, S. Cellular signalling by sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate. *IUBMB Life Int. Union Biochem. Mol. Biol. Life* **2006**, *58*, 467–472. [CrossRef]
61. Francy, J.M.; Nag, A.; Conroy, E.J.; Hengst, J.A.; Yun, J.K. Sphingosine kinase 1 expression is regulated by signaling through PI3K, AKT2, and mTOR in human coronary artery smooth muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA Gene Struct. Expr.* **2007**, *1769*, 253–265. [CrossRef]
62. Mrad, M.; Imbert, C.; Garcia, V.; Rambow, F.; Therville, N.; Carpentier, S.; Ségui, B.; Levade, T.; Azar, R.; Marine, J.-C.; et al. Downregulation of sphingosine kinase-1 induces protective tumor immunity by promoting M1 macrophage response in melanoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 71873–71886. [CrossRef] [PubMed]
63. Pyne, N.J.; Pyne, S. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 489–503. [CrossRef]
64. Garandeau, D.; Noujarède, J.; Leclerc, J.; Imbert, C.; Garcia, V.; Bats, M.-L.; Rambow, F.; Gilhodes, J.; Filleron, T.; Meyer, N.; et al. Targeting the Sphingosine 1-Phosphate Axis Exerts Potent Antitumor Activity in BRAFi-Resistant Melanomas. *Mol. Cancer Ther.* **2019**, *18*, 289–300. [CrossRef]
65. Lai, M.; Realini, N.; La Ferla, M.; Passalacqua, I.; Matteoli, G.; Ganesan, A.; Pistello, M.; Mazzanti, C.M.; Piomelli, D. Complete Acid Ceramidase ablation prevents cancer-initiating cell formation in melanoma cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 7411. [CrossRef]
66. Bedia, C.; Casas, J.; Andrieu-Abadie, N.; Fabriàs, G.; Levade, T. Acid Ceramidase Expression Modulates the Sensitivity of A375 Melanoma Cells to Dacarbazine. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 28200–28209. [CrossRef] [PubMed]
67. Han, W.S.; Yoo, J.Y.; Youn, S.W.; Kim, D.S.; Park, C.; Kim, S.Y.; Kim, K.H. Effects of C2-ceramide on the Malme-3M melanoma cell line. *J. Dermatol. Sci.* **2002**, 10. [CrossRef]
68. Deng, W.; Li, R.; Guerrera, M.; Liu, Y.; Ladisch, S. Transfection of glucosylceramide synthase antisense inhibits mouse melanoma formation. *Glycobiology* **2002**, *12*, 145–152. [CrossRef]
69. Weiss, M.; Hettmer, S.; Smith, P.; Ladisch, S. Inhibition of melanoma tumor growth by a novel inhibitor of glucosylceramide synthase. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 3654–3658. [PubMed]
70. Sorli, S.; Colié, S.; Albinet, V.; Dubrac, A.; Touriol, C.; Guilbaud, N.; Bedia, C.; Fabriàs, G.; Casas, J.; Ségui, B.; et al. The nonlysosomal β-glucosidase GBA2 promotes endoplasmic reticulum stress and impairs tumorigenicity of human melanoma cells. *FASEB J.* **2013**, *27*, 489–498. [CrossRef]
71. Nakano, J.; Raj, B.K.; Asagami, C.; Lloyd, K.O. Human melanoma cell lines deficient in GD3 ganglioside expression exhibit altered growth and tumorigenic characteristics. *J. Invest. Dermatol.* **1996**, *107*, 543–548. [CrossRef]
72. Hamamura, K.; Furukawa, K.; Hayashi, T.; Hattori, T.; Nakano, J.; Nakashima, H.; Okuda, T.; Mizutani, H.; Hattori, H.; Ueda, M.; et al. Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 11041–11046. [CrossRef] [PubMed]

73. Furukawa, K.; Kambe, M.; Miyata, M.; Ohkawa, Y.; Tajima, O.; Furukawa, K. Ganglioside GD3 induces convergence and synergism of adhesion and hepatocyte growth factor/Met signals in melanomas. *Cancer Sci.* **2014**, *105*, 52–63. [CrossRef]
74. Li, G.; Satyamoorthy, K.; Herlyn, M. Dynamics of Cell Interactions and Communications during Melanoma Development. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **2002**, *13*, 62–70. [CrossRef] [PubMed]
75. Walko, G.; Castañón, M.J.; Wiche, G. Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell Tissue Res.* **2015**, *360*, 529–544. [CrossRef] [PubMed]
76. Haass, N.K.; Smalley, K.S.M.; Herlyn, M. The Role of Altered Cell–Cell Communication in Melanoma Progression. *J. Mol. Histol.* **2003**, *35*, 309–318. [CrossRef] [PubMed]
77. Haass, N.K.; Smalley, K.S.M.; Li, L.; Herlyn, M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* **2005**, *18*, 150–159. [CrossRef]
78. Hsu, M.-Y.; Meier, F.E.; Nesbit, M.; Hsu, J.-Y.; Van Belle, P.; Elder, D.E.; Herlyn, M. E-Cadherin Expression in Melanoma Cells Restores Keratinocyte-Mediated Growth Control and Down-Regulates Expression of Invasion-Related Adhesion Receptors. *Am. J. Pathol.* **2000**, *156*, 1515–1525. [CrossRef]
79. Tamashiro, P.M.; Furuya, H.; Shimizu, Y.; Kawamori, T. Sphingosine kinase 1 mediates head & neck squamous cell carcinoma invasion through sphingosine 1-phosphate receptor 1. *Cancer Cell Int.* **2014**, *14*, 76. [CrossRef] [PubMed]
80. Liu, H.; Ma, Y.; He, H.-W.; Zhao, W.-L.; Shao, R.-G. SPHK1 (sphingosine kinase 1) induces epithelial-mesenchymal transition by promoting the autophagy-linked lysosomal degradation of CDH1/E-cadherin in hepatoma cells. *Autophagy* **2017**, *13*, 900–913. [CrossRef] [PubMed]
81. Milara, J.; Navarro, R.; Juan, G.; Peiró, T.; Serrano, A.; Ramón, M.; Morcillo, E.; Cortijo, J. Sphingosine-1-phosphate is increased in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates epithelial to mesenchymal transition. *Thorax* **2012**, *67*, 147–156. [CrossRef]
82. Kono, Y.; Nishiuma, T.; Nishimura, Y.; Kotani, Y.; Okada, T.; Nakamura, S.; Yokoyama, M. Sphingosine Kinase 1 Regulates Differentiation of Human and Mouse Lung Fibroblasts Mediated by TGF-β1. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2007**, *37*, 395–404. [CrossRef]
83. Yamaguchi, H.; Kitayama, J.; Takuwa, N.; Arikawa, K.; Inoki, I.; Takehara, K.; Nagawa, H.; Takuwa, Y. Sphingosine-1-phosphate receptor subtype-specific positive and negative regulation of Rac and haematogenous metastasis of melanoma cells. *Biochem. J.* **2003**, *374*, 715–722. [CrossRef] [PubMed]
84. Braga, V.M.M.; Machesky, L.M.; Hall, A.; Hotchin, N.A. The Small GTPases Rho and Rac Are Required for the Establishment of Cadherin-dependent Cell–Cell Contacts. *J. Cell Biol.* **1997**, *137*, 1421–1431. [CrossRef] [PubMed]
85. Ohkawa, Y.; Miyazaki, S.; Hamamura, K.; Kambe, M.; Miyata, M.; Tajima, O.; Ohmi, Y.; Yamauchi, Y.; Furukawa, K.; Furukawa, K. Ganglioside GD3 Enhances Adhesion Signals and Augments Malignant Properties of Melanoma Cells by Recruiting Integrins to Glycolipid-enriched Microdomains. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 27213–27223. [CrossRef] [PubMed]
86. Ohmi, Y.; Kambe, M.; Ohkawa, Y.; Hamamura, K.; Tajima, O.; Takeuchi, R.; Furukawa, K.; Furukawa, K. Differential roles of gangliosides in malignant properties of melanomas. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0206881. [CrossRef] [PubMed]
87. Hodorogea, A.; Calinescu, A.; Antohe, M.; Balaban, M.; Nedelcu, R.I.; Turcu, G.; Ion, D.A.; Badarau, I.A.; Popescu, C.M.; Popescu, R.; et al. Epithelial-Mesenchymal Transition in Skin Cancers: A Review. *Anal. Cell. Pathol.* **2019**, *2019*, 1–11. [CrossRef]
88. Hoek, K.S.; Schlegel, N.C.; Brafford, P.; Sucker, A.; Ugurel, S.; Kumar, R.; Weber, B.L.; Nathanson, K.L.; Phillips, D.J.; Herlyn, M.; et al. Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res.* **2006**, *19*, 290–302. [CrossRef]
89. Levy, C.; Khaled, M.; Fisher, D.E. MITF: Master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol. Med.* **2006**, *12*, 406–414. [CrossRef]
90. Goding, C.R.; Arnheiter, H. MITF—The first 25 years. *Genes Dev.* **2019**, *33*, 983–1007. [CrossRef]
91. Levy, C.; Lee, Y.-N.; Nechushtan, H.; Schueler-Furman, O.; Sonnenblick, A.; Hacohen, S.; Razin, E. Identifying a common molecular mechanism for inhibition of MITF and STAT3 by PIAS3. *Blood* **2006**, *107*, 2839–2845. [CrossRef]

92. Yasumoto, K.; Takeda, K.; Saito, H.; Watanabe, K.; Takahashi, K.; Shibahara, S. Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling. *EMBO J.* **2002**, *21*, 2703–2714. [CrossRef] [PubMed]
93. Schmelz, E.M.; Roberts, P.C.; Kustin, E.M.; Lemonnier, L.A.; Sullards, M.C.; Dillehay, D.L.; Merrill, A.H. Modulation of intracellular beta-catenin localization and intestinal tumorigenesis in vivo and in vitro by sphingolipids. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 6723–6729. [PubMed]
94. Liu, H.; Zhang, C.-X.; Ma, Y.; He, H.-W.; Wang, J.-P.; Shao, R.-G. SphK1 inhibitor SKI II inhibits the proliferation of human hepatoma HepG2 cells via the Wnt5A/β-catenin signaling pathway. *Life Sci.* **2016**, *151*, 23–29. [CrossRef] [PubMed]
95. White, C.; Alshaker, H.; Cooper, C.; Winkler, M.; Pchejetski, D. The emerging role of FTY720 (Fingolimod) in cancer treatment. *Oncotarget* **2016**, *7*, 23106–23127. [CrossRef]
96. Lee, J.E.; Kim, S.Y.; Jeong, Y.-M.; Yun, H.-Y.; Baek, K.J.; Kwon, N.S.; Park, K.-C.; Kim, D.-S. The regulatory mechanism of melanogenesis by FTY720, a sphingolipid analogue: The regulation of melanogenesis by FTY720. *Exp. Dermatol.* **2011**, *20*, 237–241. [CrossRef]
97. Caramel, J.; Papadogeorgakis, E.; Hill, L.; Browne, G.J.; Richard, G.; Wierinckx, A.; Saldanha, G.; Osborne, J.; Hutchinson, P.; Tse, G.; et al. A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma. *Cancer Cell* **2013**, *24*, 466–480. [CrossRef]
98. Lu, P.; White-Gilbertson, S.; Nganga, R.; Kester, M.; Voelkel-Johnson, C. Expression of the SNAI2 transcriptional repressor is regulated by C 16 -ceramide. *Cancer Biol. Ther.* **2019**, *20*, 922–930. [CrossRef]
99. Edmond, V.; Dufour, F.; Poiroux, G.; Shoji, K.; Malleter, M.; Fouqué, A.; Tauzin, S.; Rimokh, R.; Sergent, O.; Penna, A.; et al. Downregulation of ceramide synthase-6 during epithelial-to-mesenchymal transition reduces plasma membrane fluidity and cancer cell motility. *Oncogene* **2015**, *34*, 996–1005. [CrossRef]
100. Zheng, K.; Chen, Z.; Feng, H.; Chen, Y.; Zhang, C.; Yu, J.; Luo, Y.; Zhao, L.; Jiang, X.; Shi, F. Sphingomyelin synthase 2 promotes an aggressive breast cancer phenotype by disrupting the homoeostasis of ceramide and sphingomyelin. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 157. [CrossRef]
101. Levade, T.; Andrieu-Abadie, N.; Micheau, O.; Legembre, P.; Ségui, B. Sphingolipids modulate the epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Cell Death Discov.* **2015**, *1*, 15001. [CrossRef]
102. Mathow, D.; Chessa, F.; Rabionet, M.; Kaden, S.; Jennemann, R.; Sandhoff, R.; Gröne, H.-J.; Feuerborn, A. Zeb1 affects epithelial cell adhesion by diverting glycosphingolipid metabolism. *EMBO Rep.* **2015**, *16*, 321–331. [CrossRef] [PubMed]
103. Battula, V.L.; Shi, Y.; Evans, K.W.; Wang, R.-Y.; Spaeth, E.L.; Jacamo, R.O.; Guerra, R.; Sahin, A.A.; Marini, F.C.; Hortobagyi, G.; et al. Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis. *J. Clin. Investig.* **2012**, *122*, 2066–2078. [CrossRef]
104. Gupta, V.; Bhinge, K.N.; Hosain, S.B.; Xiong, K.; Gu, X.; Shi, R.; Ho, M.-Y.; Khoo, K.-H.; Li, S.-C.; Li, Y.-T.; et al. Ceramide glycosylation by glucosylceramide synthase selectively maintains the properties of breast cancer stem cells. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 37195–37205. [CrossRef] [PubMed]
105. Hosain, S.B.; Khiste, S.K.; Uddin, M.B.; Vorubindi, V.; Ingram, C.; Zhang, S.; Hill, R.A.; Gu, X.; Liu, Y.-Y. Inhibition of glucosylceramide synthase eliminates the oncogenic function of p53 R273H mutant in the epithelial-mesenchymal transition and induced pluripotency of colon cancer cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 60575–60592. [CrossRef]
106. Hao, Y.; Baker, D.; ten Dijke, P. TGF-β-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2767. [CrossRef] [PubMed]
107. Tsubakihara, Y.; Moustakas, A. Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis under the Control of Transforming Growth Factor β. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3672. [CrossRef] [PubMed]
108. Xin, C.; Ren, S.; Kleuser, B.; Shabahang, S.; Eberhardt, W.; Radeke, H.; Schäfer-Korting, M.; Pfeilschifter, J.; Huwiler, A. Sphingosine 1-Phosphate Cross-activates the Smad Signaling Cascade and Mimics Transforming Growth Factor-β-induced Cell Responses. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 35255–35262. [CrossRef] [PubMed]
109. Sauer, B.; Vogler, R.; von Wenckstern, H.; Fujii, M.; Anzano, M.B.; Glick, A.B.; Schäfer-Korting, M.; Roberts, A.B.; Kleuser, B. Involvement of Smad Signaling in Sphingosine 1-Phosphate-mediated Biological Responses of Keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 38471–38479. [CrossRef]
110. Radeke, H.H.; von Wenckstern, H.; Stoidtner, K.; Sauer, B.; Hammer, S.; Kleuser, B. Overlapping Signaling Pathways of Sphingosine 1-Phosphate and TGF-β in the Murine Langerhans Cell Line XS52. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 2778–2786. [CrossRef]

111. Zeng, Y.; Yao, X.; Chen, L.; Yan, Z.; Liu, J.; Zhang, Y.; Feng, T.; Wu, J.; Liu, X. Sphingosine-1-phosphate induced epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma via an MMP-7/syndecan-1/TGF-β autocrine loop. *Oncotarget* **2016**, *7*, 63324–63337. [CrossRef]
112. Liu, Y.-N.; Zhang, H.; Zhang, L.; Cai, T.-T.; Huang, D.-J.; He, J.; Ni, H.-H.; Zhou, F.-J.; Zhang, X.-S.; Li, J. Sphingosine 1 phosphate receptor-1 (S1P1) promotes tumor-associated regulatory T cell expansion: Leading to poor survival in bladder cancer. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 50. [CrossRef]
113. Miller, A.V.; Alvarez, S.E.; Spiegel, S.; Lebman, D.A. Sphingosine Kinases and Sphingosine-1-Phosphate Are Critical for Transforming Growth Factor β-Induced Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2 Activation and Promotion of Migration and Invasion of Esophageal Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 4142–4151. [CrossRef] [PubMed]
114. Yamanaka, M.; Shegogue, D.; Pei, H.; Bu, S.; Bielawska, A.; Bielawski, J.; Pettus, B.; Hannun, Y.A.; Obeid, L.; Trojanowska, M. Sphingosine Kinase 1 (SPHK1) Is Induced by Transforming Growth Factor-β and Mediates TIMP-1 Up-regulation. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 53994–54001. [CrossRef] [PubMed]
115. Verfaillie, A.; Imrichova, H.; Atak, Z.K.; Dewaele, M.; Rambow, F.; Hulselmans, G.; Christiaens, V.; Svetlichnyy, D.; Luciani, F.; Van den Mooter, L.; et al. Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6683. [CrossRef] [PubMed]
116. Nallet-Staub, F.; Marsaud, V.; Li, L.; Gilbert, C.; Dodier, S.; Bataille, V.; Sudol, M.; Herlyn, M.; Mauviel, A. Pro-invasive activity of the Hippo pathway effectors YAP and TAZ in cutaneous melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **2014**, *134*, 123–132. [CrossRef]
117. Miller, E.; Yang, J.; DeRan, M.; Wu, C.; Su, A.I.; Bonamy, G.M.C.; Liu, J.; Peters, E.C.; Wu, X. Identification of Serum-Derived Sphingosine-1-Phosphate as a Small Molecule Regulator of YAP. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 955–962. [CrossRef]
118. Yu, F.-X.; Zhao, B.; Panupinthu, N.; Jewell, J.L.; Lian, I.; Wang, L.H.; Zhao, J.; Yuan, H.; Tumaneng, K.; Li, H.; et al. Regulation of the Hippo-YAP Pathway by G-Protein-Coupled Receptor Signaling. *Cell* **2012**, *150*, 780–791. [CrossRef]
119. Pors, S.E.; Harðardóttir, L.; Olesen, H.Ø.; Riis, M.L.; Jensen, L.B.; Andersen, A.S.; Cadenas, J.; Grønning, A.P.; Colmorn, L.B.; Dueholm, M.; et al. Effect of sphingosine-1-phosphate on activation of dormant follicles in murine and human ovarian tissue. *Mol. Hum. Reprod.* **2020**, gaaa022. [CrossRef]
120. Huang, L.S.; Sudhadevi, T.; Fu, P.; Punathil-Kannan, P.-K.; Ebenezer, D.L.; Ramchandran, R.; Putherickal, V.; Cheresh, P.; Zhou, G.; Ha, A.W.; et al. Sphingosine Kinase 1/S1P Signaling Contributes to Pulmonary Fibrosis by Activating Hippo/YAP Pathway and Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Lung Fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2064. [CrossRef]
121. Kemppainen, K.; Wentus, N.; Lassila, T.; Laiho, A.; Törnquist, K. Sphingosylphosphorylcholine regulates the Hippo signaling pathway in a dual manner. *Cell. Signal.* **2016**, *28*, 1894–1903. [CrossRef]
122. Arikawa, K.; Takuwa, N.; Yamaguchi, H.; Sugimoto, N.; Kitayama, J.; Nagawa, H.; Takehara, K.; Takuwa, Y. Ligand-dependent Inhibition of B16 Melanoma Cell Migration and Invasion via Endogenous S1P 2 G Protein-coupled Receptor: REQUIREMENT OF INHIBITION OF CELLULAR RAC ACTIVITY. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 32841–32851. [CrossRef]
123. Carpinteiro, A.; Becker, K.A.; Japtok, L.; Hessler, G.; Keitsch, S.; Požgajovà, M.; Schmid, K.W.; Adams, C.; Müller, S.; Kleuser, B.; et al. Regulation of hematogenous tumor metastasis by acid sphingomyelinase. *EMBO Mol. Med.* **2015**, *7*, 714–734. [CrossRef]
124. Tsuchida, T.; Saxton, R.E.; Morton, D.L.; Irie, R.F. Gangliosides of human melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **1987**, *78*, 45–54. [CrossRef] [PubMed]
125. Sawada, M.; Moriya, S.; Shineha, R.; Satomi, S.; Miyagi, T. Comparative study of sialidase activity and G(M3) content in B16 melanoma variants with different metastatic potential. *Acta Biochim. Pol.* **1998**, *45*, 343–349. [CrossRef] [PubMed]
126. Saha, S.; Mohanty, K.C. Enhancement of metastatic potential of mouse B16-melanoma cells to lung after treatment with gangliosides of B-16-melanoma cells of higher metastatic potential to lung. *Indian J. Exp. Biol.* **2003**, *41*, 1253–1258. [PubMed]
127. Liu, J.-W.; Sun, P.; Yan, Q.; Paller, A.S.; Gerami, P.; Ho, N.; Vashi, N.; Le Poole, I.C.; Wang, X.-Q. De-N-acetyl GM3 Promotes Melanoma Cell Migration and Invasion through Urokinase Plasminogen Activator Receptor Signaling-Dependent MMP-2 Activation. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 8662–8669. [CrossRef]

128. Peinado, H.; Alečković, M.; Lavotshkin, S.; Matei, I.; Costa-Silva, B.; Moreno-Bueno, G.; Hergueta-Redondo, M.; Williams, C.; García-Santos, G.; Ghajar, C.M.; et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 883–891. [CrossRef]
129. Costa-Silva, B.; Aiello, N.M.; Ocean, A.J.; Singh, S.; Zhang, H.; Thakur, B.K.; Becker, A.; Hoshino, A.; Mark, M.T.; Molina, H.; et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 816–826. [CrossRef]
130. Hoshino, A.; Costa-Silva, B.; Shen, T.-L.; Rodrigues, G.; Hashimoto, A.; Tesic Mark, M.; Molina, H.; Kohsaka, S.; Di Giannatale, A.; Ceder, S.; et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **2015**, *527*, 329–335. [CrossRef]
131. Raposo, G.; Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* **2013**, *200*, 373–383. [CrossRef]
132. Xiao, D.; Barry, S.; Kmetz, D.; Egger, M.; Pan, J.; Rai, S.N.; Qu, J.; McMasters, K.M.; Hao, H. Melanoma cell–derived exosomes promote epithelial–mesenchymal transition in primary melanocytes through paracrine/autocrine signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Lett.* **2016**, *376*, 318–327. [CrossRef] [PubMed]
133. Hood, J.L.; San, R.S.; Wickline, S.A. Exosomes Released by Melanoma Cells Prepare Sentinel Lymph Nodes for Tumor Metastasis. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 3792–3801. [CrossRef] [PubMed]
134. Trajkovic, K.; Hsu, C.; Chiantia, S.; Rajendran, L.; Wenzel, D.; Wieland, F.; Schwille, P.; Brugger, B.; Simons, M. Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science* **2008**, *319*, 1244–1247. [CrossRef] [PubMed]
135. López-Montero, I.; Vélez, M.; Devaux, P.F. Surface tension induced by sphingomyelin to ceramide conversion in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA Biomembr.* **2007**, *1768*, 553–561. [CrossRef]
136. Kosaka, N.; Iguchi, H.; Yoshioka, Y.; Takeshita, F.; Matsuki, Y.; Ochiya, T. Secretory Mechanisms and Intercellular Transfer of MicroRNAs in Living Cells. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 17442–17452. [CrossRef] [PubMed]
137. Kosaka, N.; Iguchi, H.; Hagiwara, K.; Yoshioka, Y.; Takeshita, F.; Ochiya, T. Neutral Sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent Exosomal Transfer of Angiogenic MicroRNAs Regulate Cancer Cell Metastasis. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 10849–10859. [CrossRef]
138. Kajimoto, T.; Okada, T.; Miya, S.; Zhang, L.; Nakamura, S. Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2712. [CrossRef]
139. Mohamed, N.N.I.; Okada, T.; Kajimoto, T.; Nakamura, S.-I. Essential Role of Sphingosine Kinase 2 in the Regulation of Cargo Contents in the Exosomes from K562 Cells. *Kobe J. Med. Sci.* **2018**, *63*, E123–E129.
140. Kajimoto, T.; Mohamed, N.N.I.; Badawy, S.M.M.; Matovelo, S.A.; Hirase, M.; Nakamura, S.; Yoshida, D.; Okada, T.; Ijuin, T.; Nakamura, S. Involvement of Gβγ subunits of G i protein coupled with S1P receptor on multivesicular endosomes in F-actin formation and cargo sorting into exosomes. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 245–253. [CrossRef]
141. Schumacher, T.N.; Schreiber, R.D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* **2015**, *348*, 69–74. [CrossRef]
142. Dunn, G.P.; Bruce, A.T.; Ikeda, H.; Old, L.J.; Schreiber, R.D. Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 991–998. [CrossRef]
143. Kim, R.; Emi, M.; Tanabe, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* **2007**, *121*, 1–14. [CrossRef] [PubMed]
144. Mandala, S.; Hadju, R.; Bergstrom, J.; Quackenbush, E.; Xie, J.; Milligan, J.; Thornton, R.; Shei, G.-J.; Card, D. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* **2002**, *296*, 346–349. [CrossRef] [PubMed]
145. Matloubian, M.; Lo, C.G.; Cinamon, G.; Lesneski, M.J.; Xu, Y.; Brinkmann, V.; Allende, M.L.; Proia, R.L.; Cyster, J.G. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* **2004**, *427*, 355–360. [CrossRef] [PubMed]
146. Resop, R.S.; Douaisi, M.; Craft, J.; Jachimowski, L.C.M.; Blom, B.; Uittenbogaart, C.H. Sphingosine-1-phosphate/sphingosine-1-phosphate receptor 1 signaling is required for migration of naive human T cells from the thymus to the periphery. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2016**, *138*, 551–557.e8. [CrossRef] [PubMed]

147. Lo, C.G.; Xu, Y.; Proia, R.L.; Cyster, J.G. Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression during lymphocyte recirculation and relationship to lymphoid organ transit. *J. Exp. Med.* **2005**, *201*, 291–301. [CrossRef]
148. Bankovich, A.J.; Shiow, L.R.; Cyster, J.G. CD69 Suppresses Sphingosine 1-Phosophate Receptor-1 (S1P 1) Function through Interaction with Membrane Helix 4. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 22328–22337. [CrossRef]
149. Shiow, L.R.; Rosen, D.B.; Brdičková, N.; Xu, Y.; An, J.; Lanier, L.L.; Cyster, J.G.; Matloubian, M. CD69 acts downstream of interferon-α/β to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* **2006**, *440*, 540–544. [CrossRef]
150. Mackay, L.K.; Braun, A.; Macleod, B.L.; Collins, N.; Tebartz, C.; Bedoui, S.; Carbone, F.R.; Gebhardt, T. Cutting Edge: CD69 Interference with Sphingosine-1-Phosphate Receptor Function Regulates Peripheral T Cell Retention. *J. Immunol.* **2015**, *194*, 2059–2063. [CrossRef]
151. Skon, C.N.; Lee, J.-Y.; Anderson, K.G.; Masopust, D.; Hogquist, K.A.; Jameson, S.C. Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 1285–1293. [CrossRef]
152. Amsen, D.; van Gisbergen, K.P.J.M.; Hombrink, P.; van Lier, R.A.W. Tissue-resident memory T cells at the center of immunity to solid tumors. *Nat. Immunol.* **2018**, *19*, 538–546. [CrossRef] [PubMed]
153. Gebhardt, T.; Wakim, L.M.; Eidsmo, L.; Reading, P.C.; Heath, W.R.; Carbone, F.R. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat. Immunol.* **2009**, *10*, 524–530. [CrossRef]
154. Park, S.L.; Buzzai, A.; Rautela, J.; Hor, J.L.; Hochheiser, K.; Effern, M.; McBain, N.; Wagner, T.; Edwards, J.; McConville, R.; et al. Tissue-resident memory CD8+ T cells promote melanoma–immune equilibrium in skin. *Nature* **2019**, *565*, 366–371. [CrossRef] [PubMed]
155. Menares, E.; Gálvez-Cancino, F.; Cáceres-Morgado, P.; Ghorani, E.; López, E.; Díaz, X.; Saavedra-Almarza, J.; Figueroa, D.A.; Roa, E.; Quezada, S.A.; et al. Tissue-resident memory CD8+ T cells amplify anti-tumor immunity by triggering antigen spreading through dendritic cells. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4401. [CrossRef] [PubMed]
156. Hochheiser, K.; Aw Yeang, H.X.; Wagner, T.; Tutuka, C.; Behren, A.; Waithman, J.; Angel, C.; Neeson, P.J.; Gebhardt, T.; Gyorki, D.E. Accumulation of CD103 + CD8 + T cells in a cutaneous melanoma micrometastasis. *Clin. Transl. Immunol.* **2019**, *8*. [CrossRef]
157. Drouillard, A.; Neyra, A.; Mathieu, A.-L.; Marçais, A.; Wencker, M.; Marvel, J.; Belot, A.; Walzer, T. Human Naive and Memory T Cells Display Opposite Migratory Responses to Sphingosine-1 Phosphate. *J. Immunol.* **2018**, *200*, 551–557. [CrossRef]
158. Sic, H.; Kraus, H.; Madl, J.; Flittner, K.-A.; von Münchow, A.L.; Pieper, K.; Rizzi, M.; Kienzler, A.-K.; Ayata, K.; Rauer, S.; et al. Sphingosine-1-phosphate receptors control B-cell migration through signaling components associated with primary immunodeficiencies, chronic lymphocytic leukemia, and multiple sclerosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2014**, *134*, 420–428.e15. [CrossRef]
159. Walzer, T.; Chiossone, L.; Chaix, J.; Calver, A.; Carozzo, C.; Garrigue-Antar, L.; Jacques, Y.; Baratin, M.; Tomasello, E.; Vivier, E. Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nat. Immunol.* **2007**, *8*, 1337–1344. [CrossRef]
160. Drouillard, A.; Mathieu, A.-L.; Marçais, A.; Belot, A.; Viel, S.; Mingueneau, M.; Guckian, K.; Walzer, T. S1PR5 is essential for human natural killer cell migration toward sphingosine-1 phosphate. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *141*, 2265–2268.e1. [CrossRef]
161. Jenne, C.N.; Enders, A.; Rivera, R.; Watson, S.R.; Bankovich, A.J.; Pereira, J.P.; Xu, Y.; Roots, C.M.; Beilke, J.N.; Banerjee, A.; et al. T-bet–dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow. *J. Exp. Med.* **2009**, *206*, 2469–2481. [CrossRef]
162. Mayol, K.; Biajoux, V.; Marvel, J.; Balabanian, K.; Walzer, T. Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking. *Blood* **2011**, *118*, 4863–4871. [CrossRef] [PubMed]
163. Liu, G.; Yang, K.; Burns, S.; Shrestha, S.; Chi, H. The S1P1-mTOR axis directs the reciprocal differentiation of TH1 and Treg cells. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 1047–1056. [CrossRef] [PubMed]
164. Chakraborty, P.; Vaena, S.G.; Thyagarajan, K.; Chatterjee, S.; Al-Khami, A.; Selvam, S.P.; Nguyen, H.; Kang, I.; Wyatt, M.W.; Baliga, U.; et al. Pro-Survival Lipid Sphingosine-1-Phosphate Metabolically Programs T Cells to Limit Anti-tumor Activity. *Cell Rep.* **2019**, *28*, 1879–1893.e7. [CrossRef] [PubMed]

165. Sanger Mouse Genetics Project; van der Weyden, L.; Arends, M.J.; Campbell, A.D.; Bald, T.; Wardle-Jones, H.; Griggs, N.; Velasco-Herrera, M.D.C.; Tüting, T.; Sansom, O.J.; et al. Genome-wide in vivo screen identifies novel host regulators of metastatic colonization. *Nature* **2017**, *541*, 233–236. [CrossRef] [PubMed]
166. Assi, E.; Cervia, D.; Bizzozero, L.; Capobianco, A.; Pambianco, S.; Morisi, F.; De Palma, C.; Moscheni, C.; Pellegrino, P.; Clementi, E.; et al. Modulation of Acid Sphingomyelinase in Melanoma Reprogrammes the Tumour Immune Microenvironment. *Mediators Inflamm.* **2015**, *2015*, 1–13. [CrossRef]
167. Coerdt, I.; Full-Scharrer, G.; Hösl, E. Long-term results in surgical treatment of cleft lips and palates. *Prog. Pediatr. Surg.* **1977**, *10*, 1–3.
168. Nakagawa, R.; Serizawa, I.; Motoki, K.; Sato, M.; Ueno, H.; Iijima, R.; Nakamura, H.; Shimosaka, A.; Koezuka, Y. Antitumor activity of alpha-galactosylceramide, KRN7000, in mice with the melanoma B16 hepatic metastasis and immunohistological study of tumor infiltrating cells. *Oncol. Res.* **2000**, *12*, 51–58. [CrossRef]
169. Ghosh, S.; Juin, S.K.; Nandi, P.; Majumdar, S.B.; Bose, A.; Baral, R.; Sil, P.C.; Majumdar, S. PKCζ mediated anti-proliferative effect of C2 ceramide on neutralization of the tumor microenvironment and melanoma regression. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **2020**, *69*, 611–627. [CrossRef]
170. Tiwary, S.; Berzofsky, J.A.; Terabe, M. Altered Lipid Tumor Environment and Its Potential Effects on NKT Cell Function in Tumor Immunity. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2187. [CrossRef]
171. Bay, S.; Fort, S.; Birikaki, L.; Ganneau, C.; Samain, E.; Coïc, Y.-M.; Bonhomme, F.; Dériaud, E.; Leclerc, C.; Lo-Man, R. Induction of a melanoma-specific antibody response by a monovalent, but not a divalent, synthetic GM2 neoglycopeptide. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 582–587. [CrossRef]
172. Fernandez, L.E.; Gabri, M.R.; Guthmann, M.D.; Gomez, R.E.; Gold, S.; Fainboim, L.; Gomez, D.E.; Alonso, D.F. NGcGM3 ganglioside: A privileged target for cancer vaccines. *Clin. Dev. Immunol.* **2010**, *2010*, 814397. [CrossRef]
173. Pérez, K.; Osorio, M.; Hernández, J.; Carr, A.; Fernández, L.E. NGcGM3/VSSP vaccine as treatment for melanoma patients. *Hum. Vaccines Immunother.* **2013**, *9*, 1237–1240. [CrossRef] [PubMed]
174. Bernhard, H.; Meyer zum Büschenfelde, K.H.; Dippold, W.G. Ganglioside GD3 shedding by human malignant melanoma cells. *Int. J. Cancer* **1989**, *44*, 155–160. [CrossRef] [PubMed]
175. Portoukalian, J.; Zwingelstein, G.; Abdul-Malak, N.; Doré, J.F. Alteration of gangliosides in plasma and red cells of humans bearing melanoma tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *85*, 916–920. [CrossRef]
176. Péguet-Navarro, J.; Sportouch, M.; Popa, I.; Berthier, O.; Schmitt, D.; Portoukalian, J. Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2003**, *170*, 3488–3494. [CrossRef]
177. Bennaceur, K.; Popa, I.; Chapman, J.A.; Migdal, C.; Péguet-Navarro, J.; Touraine, J.-L.; Portoukalian, J. Different mechanisms are involved in apoptosis induced by melanoma gangliosides on human monocyte-derived dendritic cells. *Glycobiology* **2009**, *19*, 576–582. [CrossRef]
178. Tsao, C.-Y.; Sabbatino, F.; Cheung, N.-K.V.; Hsu, J.C.-F.; Villani, V.; Wang, X.; Ferrone, S. Anti-proliferative and pro-apoptotic activity of GD2 ganglioside-specific monoclonal antibody 3F8 in human melanoma cells. *Oncoimmunology* **2015**, *4*, e1023975. [CrossRef]
179. Kushner, B.H.; Cheung, I.Y.; Modak, S.; Basu, E.M.; Roberts, S.S.; Cheung, N.-K. Humanized 3F8 Anti-GD2 Monoclonal Antibody Dosing With Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Patients With Resistant Neuroblastoma: A Phase 1 Clinical Trial. *JAMA Oncol.* **2018**, *4*, 1729–1735. [CrossRef]
180. Kramer, K.; Pandit-Taskar, N.; Humm, J.L.; Zanzonico, P.B.; Haque, S.; Dunkel, I.J.; Wolden, S.L.; Donzelli, M.; Goldman, D.A.; Lewis, J.S.; et al. A phase II study of radioimmunotherapy with intraventricular 131 I-3F8 for medulloblastoma. *Pediatr. Blood Cancer* **2018**, *65*. [CrossRef]
181. Yu, J.; Wu, X.; Yan, J.; Yu, H.; Xu, L.; Chi, Z.; Sheng, X.; Si, L.; Cui, C.; Dai, J.; et al. Anti-GD2/4-1BB chimeric antigen receptor T cell therapy for the treatment of Chinese melanoma patients. *J. Hematol. Oncol. J. Hematol. Oncol.* **2018**, *11*, 1. [CrossRef]
182. Albertini, M.R.; Yang, R.K.; Ranheim, E.A.; Hank, J.A.; Zuleger, C.L.; Weber, S.; Neuman, H.; Hartig, G.; Weigel, T.; Mahvi, D.; et al. Pilot trial of the hu14.18-IL2 immunocytokine in patients with completely resectable recurrent stage III or stage IV melanoma. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **2018**, *67*, 1647–1658. [CrossRef] [PubMed]

183. Wu, Y.; Deng, W.; McGinley, E.C.; Klinke, D.J. Melanoma exosomes deliver a complex biological payload that upregulates PTPN11 to suppress T lymphocyte function. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2017**, *30*, 203–218. [CrossRef] [PubMed]
184. Zhou, J.; Yang, Y.; Wang, W.; Zhang, Y.; Chen, Z.; Hao, C.; Zhang, J. Melanoma-released exosomes directly activate the mitochondrial apoptotic pathway of CD4+ T cells through their microRNA cargo. *Exp. Cell Res.* **2018**, *371*, 364–371. [CrossRef] [PubMed]
185. Düchler, M.; Czernek, L.; Peczek, L.; Cypryk, W.; Sztiller-Sikorska, M.; Czyz, M. Melanoma-Derived Extracellular Vesicles Bear the Potential for the Induction of Antigen-Specific Tolerance. *Cells* **2019**, *8*, 665. [CrossRef] [PubMed]
186. Vignard, V.; Labbé, M.; Marec, N.; André-Grégoire, G.; Jouand, N.; Fonteneau, J.-F.; Labarrière, N.; Fradin, D. MicroRNAs in Tumor Exosomes Drive Immune Escape in Melanoma. *Cancer Immunol. Res.* **2020**, *8*, 255–267. [CrossRef] [PubMed]
187. Sharma, P.; Diergaarde, B.; Ferrone, S.; Kirkwood, J.M.; Whiteside, T.L. Melanoma cell-derived exosomes in plasma of melanoma patients suppress functions of immune effector cells. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 92. [CrossRef]
188. Chen, G.; Huang, A.C.; Zhang, W.; Zhang, G.; Wu, M.; Xu, W.; Yu, Z.; Yang, J.; Wang, B.; Sun, H.; et al. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* **2018**, *560*, 382–386. [CrossRef]
189. Poggio, M.; Hu, T.; Pai, C.-C.; Chu, B.; Belair, C.D.; Chang, A.; Montabana, E.; Lang, U.E.; Fu, Q.; Fong, L.; et al. Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-tumor Immunity and Memory. *Cell* **2019**, *177*, 414–427.e13. [CrossRef]
190. Falkson, C.I.; Ibrahim, J.; Kirkwood, J.M.; Coates, A.S.; Atkins, M.B.; Blum, R.H. Phase III trial of dacarbazine versus dacarbazine with interferon alpha-2b versus dacarbazine with tamoxifen versus dacarbazine with interferon alpha-2b and tamoxifen in patients with metastatic malignant melanoma: An Eastern Cooperative Oncology Group study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **1998**, *16*, 1743–1751. [CrossRef]
191. Middleton, M.R.; Grob, J.J.; Aaronson, N.; Fierlbeck, G.; Tilgen, W.; Seiter, S.; Gore, M.; Aamdal, S.; Cebon, J.; Coates, A.; et al. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2000**, *18*, 158–166. [CrossRef]
192. Avril, M.F.; Aamdal, S.; Grob, J.J.; Hauschild, A.; Mohr, P.; Bonerandi, J.J.; Weichenthal, M.; Neuber, K.; Bieber, T.; Gilde, K.; et al. Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: A phase III study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2004**, *22*, 1118–1125. [CrossRef] [PubMed]
193. Flaherty, K.T.; Robert, C.; Hersey, P.; Nathan, P.; Garbe, C.; Milhem, M.; Demidov, L.V.; Hassel, J.C.; Rutkowski, P.; Mohr, P.; et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *367*, 107–114. [CrossRef] [PubMed]
194. Tian, Y.; Guo, W. A Review of the Molecular Pathways Involved in Resistance to BRAF Inhibitors in Patients with Advanced-Stage Melanoma. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **2020**, *26*, e920957. [CrossRef] [PubMed]
195. Schadendorf, D.; Hodi, F.S.; Robert, C.; Weber, J.S.; Margolin, K.; Hamid, O.; Patt, D.; Chen, T.-T.; Berman, D.M.; Wolchok, J.D. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 1889–1894. [CrossRef] [PubMed]
196. Robert, C.; Schachter, J.; Long, G.V.; Arance, A.; Grob, J.J.; Mortier, L.; Daud, A.; Carlino, M.S.; McNeil, C.; Lotem, M.; et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 2521–2532. [CrossRef] [PubMed]
197. Robert, C.; Long, G.V.; Brady, B.; Dutriaux, C.; Maio, M.; Mortier, L.; Hassel, J.C.; Rutkowski, P.; McNeil, C.; Kalinka-Warzocha, E.; et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 320–330. [CrossRef]
198. Larkin, J.; Chiarion-Sileni, V.; Gonzalez, R.; Grob, J.-J.; Rutkowski, P.; Lao, C.D.; Cowey, C.L.; Schadendorf, D.; Wagstaff, J.; Dummer, R.; et al. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 1535–1546. [CrossRef]
199. Postow, M.A. Managing immune checkpoint-blocking antibody side effects. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* **2015**, 76–83. [CrossRef]

200. Suo, A.; Chan, Y.; Beaulieu, C.; Kong, S.; Cheung, W.Y.; Monzon, J.G.; Smylie, M.; Walker, J.; Morris, D.; Cheng, T. Anti-PD1-Induced Immune-Related Adverse Events and Survival Outcomes in Advanced Melanoma. *Oncologist* **2020**, *25*, 438–446. [CrossRef]
201. Cervia, D.; Assi, E.; De Palma, C.; Giovarelli, M.; Bizzozero, L.; Pambianco, S.; Di Renzo, I.; Zecchini, S.; Moscheni, C.; Vantaggiato, C.; et al. Essential role for acid sphingomyelinase-inhibited autophagy in melanoma response to cisplatin. *Oncotarget* **2016**, *7*. [CrossRef]
202. Ishitsuka, A.; Fujine, E.; Mizutani, Y.; Tawada, C.; Kanoh, H.; Banno, Y.; Seishima, M. FTY720 and cisplatin synergistically induce the death of cisplatin-resistant melanoma cells through the downregulation of the PI3K pathway and the decrease in epidermal growth factor receptor expression. *Int. J. Mol. Med.* **2014**, *34*, 1169–1174. [CrossRef] [PubMed]
203. Bektas, M.; Jolly, P.S.; Müller, C.; Eberle, J.; Spiegel, S.; Geilen, C.C. Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: Role of Bcl-2 expression. *Oncogene* **2005**, *24*, 178–187. [CrossRef] [PubMed]
204. Takahashi, T.; Abe, N.; Kanoh, H.; Banno, Y.; Seishima, M. Synergistic effects of vemurafenib and fingolimod (FTY720) in vemurafenib-resistant melanoma cell lines. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *18*, 5151–5158. [CrossRef] [PubMed]
205. Ji, C.; Yang, Y.-L.; He, L.; Gu, B.; Xia, J.-P.; Sun, W.-L.; Su, Z.-L.; Chen, B.; Bi, Z.-G. Increasing ceramides sensitizes genistein-induced melanoma cell apoptosis and growth inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *421*, 462–467. [CrossRef] [PubMed]
206. Tran, M.A.; Smith, C.D.; Kester, M.; Robertson, G.P. Combining nanoliposomal ceramide with sorafenib synergistically inhibits melanoma and breast cancer cell survival to decrease tumor development. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2008**, *14*, 3571–3581. [CrossRef] [PubMed]
207. Zhang, P.; Fu, C.; Hu, Y.; Dong, C.; Song, Y.; Song, E. C6-ceramide nanoliposome suppresses tumor metastasis by eliciting PI3K and PKCζ tumor-suppressive activities and regulating integrin affinity modulation. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9275. [CrossRef]
208. Kobayashi, E.; Motoki, K.; Uchida, T.; Fukushima, H.; Koezuka, Y. KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities. *Oncol. Res.* **1995**, *7*, 529–534.
209. Guthmann, M.D.; Bitton, R.J.; Carnero, A.J.L.; Gabri, M.R.; Cinat, G.; Koliren, L.; Lewi, D.; Fernandez, L.E.; Alonso, D.F.; Gómez, D.E.; et al. Active specific immunotherapy of melanoma with a GM3 ganglioside-based vaccine: A report on safety and immunogenicity. *J. Immunother.* **2004**, *27*, 442–451. [CrossRef]
210. Irie, R.F.; Ollila, D.W.; O'Day, S.; Morton, D.L. Phase I pilot clinical trial of human IgM monoclonal antibody to ganglioside GM3 in patients with metastatic melanoma. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **2004**, *53*, 110–117. [CrossRef]
211. Musumarra, G.; Barresi, V.; Condorelli, D.F.; Scirè, S. A bioinformatic approach to the identification of candidate genes for the development of new cancer diagnostics. *Biol. Chem.* **2003**, *384*, 321–327. [CrossRef]
212. Ene (Nicolae), C.-D.; Nicolae, I. Gangliosides and Antigangliosides in Malignant Melanoma. In *Melanoma—Current Clinical Management and Future Therapeutics*; Murph, M., Ed.; Intech: London, UK, 2015; ISBN 978-953-51-2036-0.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).