



HAL
open science

Caractérisation d'une signature sphingolipidique d'immunoéchappement dans le cancer du sein triple négatif

Michaël Peres

► **To cite this version:**

Michaël Peres. Caractérisation d'une signature sphingolipidique d'immunoéchappement dans le cancer du sein triple négatif. Immunologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30337 . tel-02918110

HAL Id: tel-02918110

<https://theses.hal.science/tel-02918110>

Submitted on 20 Aug 2020

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Michaël Pérès

le mercredi 12 décembre 2018

Titre :

Caractérisation d'une signature sphingolipidique d'immunoéchappement dans
le cancer du sein triple négatif

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Immunologie

Unité de recherche :

UMR1037 CRCT (Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse)

Directeur/trice(s) de Thèse :

Pr Bruno Ségui (Directeur de thèse)
Dr Céline Colacios (Co-Directrice de Thèse)

Jury :

Dr Christophe Caux (DR2), Rapporteur
Pr Sylvain Ladoire (PU-PH), Rapporteur
Pr Hervé Le Stunff (PU), Rapporteur
Pr Florence Dalenc (PU-PH), Examinatrice

RESUME

Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent et celui qui cause le plus de décès dans le monde. Il existe plusieurs types de cancer du sein qui diffèrent par l'expression des récepteurs aux œstrogènes, à la progestérone et du récepteur HER2. Le cancer du sein dit triple négatif (TNBC) n'exprime aucun de ces récepteurs. Le métabolisme des sphingolipides (SL) est fréquemment altéré dans les cancers du sein et semble participer à la progression tumorale. Tandis que les SL ont été décrits comme modulateurs des réponses immunitaires dans des modèles précliniques de cancer, il n'existe pas à ce jour d'étude chez l'Homme évaluant l'impact des altérations du métabolisme des SL sur le développement tumoral et la réponse immunitaire associée. Dans ce contexte, l'objectif de nos travaux est double. **Le premier objectif** est de caractériser une signature sphingolipidique dans des biopsies de tumeurs mammaires humaines de divers sous-types histologiques. Une analyse par spectrométrie de masse à haute résolution nous a permis d'identifier dans les TNBC des taux élevés de SL en -C24:0, qui pourraient constituer des biomarqueurs potentiels pour ce type de cancer. **Le deuxième objectif** est d'établir une signature sphingolipidique associée à la réponse immunitaire dans le cancer du sein. Nous avons analysé les lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) par cytométrie en flux et par immunohistochimie dans nos échantillons tumoraux. Ces analyses nous ont permis de montrer que, dans les TNBC, les taux de C16:0-céramide sont corrélés positivement avec la proportion de TIL CD8⁺ et négativement avec celle des Treg FoxP3⁺. Afin d'évaluer l'influence potentielle des SL sur la topologie d'infiltration des lymphocytes (intratumoral *versus* adjacent), nous avons aussi comparé les taux de SL dans les tumeurs ayant une forte ou une faible proportion de lymphocytes T CD8⁺ intratumoraux. Nous avons observé notamment des taux élevés de sphingosine-1-phosphate (S1P) dans les tumeurs faiblement infiltrées par les lymphocytes T CD8⁺ intratumoraux. Nos observations suggèrent que la production de C16:0-céramide soit en faveur d'un recrutement préférentiel des lymphocytes T CD8⁺ dans les TNBC, tandis que la S1P pourrait être un facteur d'immunoéchappement, impactant négativement sur la topologie des TIL CD8⁺ dans les tumeurs mammaires. L'ensemble de nos travaux indique que certains SL pourraient constituer des biomarqueurs originaux de TNBC. De plus, la reprogrammation de ce métabolisme pourrait augmenter (i) quantitativement et qualitativement l'infiltration intratumorale des lymphocytes, et (ii) potentiellement l'efficacité des immunothérapies dans le cancer du sein.

ABSTRACT

Breast cancer, the most common malignancy affecting women, is responsible for the majority of woman death by cancer worldwide. There are three different breast cancer types defined by the expression of oestrogen and progesterone and HER2 receptors. The so-called triple negative breast cancer (TNBC), doesn't express any of these receptors. Sphingolipid (SL) metabolism is frequently altered in breast cancer, alterations are associated with tumour progression. Although SL can act as immune response modulators in preclinical cancer models, there are, to date, no study assessing the impact of SL metabolism alterations on tumor development and associated immune response in Humans. In this setting, our aim was double. Our first objective was to characterize the SL signature in human mammary tumour biopsies from different pathological subtypes. Using high-resolution mass spectrometry assay, we identified elevated levels of C24:0-SL in TNBC, which could be used as potential biomarkers of this cancer subtype. Our second objective was to identify a SL signature associated with immune responses in breast cancer tissues. Tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) were analyzed by flow cytometry and immunohistochemistry. Those analyses showed that, in TNBC, levels of C16:0-ceramide are positively correlated with the proportion CD8⁺ TIL and negatively correlated with that of FoxP3⁺ Treg TIL. In order to evaluate the potential influence of SL on the topology of infiltrating lymphocytes (intratumoural *versus* adjacent), we compared the SL levels in tumors depicting high or low proportions of intratumoral CD8⁺ T cells. We observed higher levels of sphingosine-1-phosphate (S1P) in low infiltrated intratumoral CD8⁺ T cells. Our observations suggest that C16:0-ceramide production could favor CD8⁺ T cell recruitment in TNBC, whereas S1P could act as an immune escape factor, negatively impacting on CD8⁺ TIL topology in mammary tumours. Our whole work indicates that a set of specific SL could constitute original biomarkers in TNBC. Moreover, reprogramming SL metabolism could improve (i) the infiltration of tumours by lymphocytes, both in terms of quality and quantity, and (ii) possibly, the efficacy of immunotherapy in breast cancer.

Remerciements

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur Bruno Ségui, Professeur de biologie cellulaire à la faculté de pharmacie de Toulouse, pour m'avoir encadré durant ce travail de thèse. Merci pour tous tes encouragements et surtout tes conseils avisés, il y en a beaucoup que je vais continuer à suivre même après.

Je remercie également chaleureusement Madame Céline Colacios, Maitre de conférences en immunologie à la faculté de pharmacie de Toulouse, pour m'avoir guidé et fait avancer dans ce travail de thèse. Merci pour ta gentillesse et ta bienveillance qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions possibles.

Je tiens à remercier Monsieur Christophe Caux, Directeur de recherche au centre de recherche en cancérologie de Lyon, Monsieur Sylvain Ladoire, Professeur de cancérologie à la faculté de médecine de Dijon et Monsieur Hervé Le Stunff, Professeur de biologie cellulaire à l'université de Paris-Sud, d'avoir accepté de juger ce travail. Soyez assurés de ma reconnaissance pour le temps que vous avez passé à lire ce travail, vos remarques pertinentes vont surement enrichir cette thèse au-delà du simple manuscrit.

Je remercie tout particulièrement Madame Florence Dalenc, Professeur de Cancérologie à la faculté de Médecine de Toulouse pour avoir accepté de présider ce jury. Tu m'as permis de remettre ce projet sur des bonnes bases et je t'en suis extrêmement reconnaissant.

Mes remerciements vont aussi à Madame le Docteur Magalie Lacroix-Tricki pour avoir nous avoir aidés à commencer ce projet et à Monsieur le Docteur Camille Franchet pour avoir repris la suite avec enthousiasme, ce projet n'aurait pas pu commencer et aboutir sans vous.

Je voulais aussi remercier Nathalie Andrieu-Abadie et Thierry Levade de m'avoir accepté en thèse dans l'équipe. Merci pour vos conseils sur mon projet de thèse qui m'ont permis d'arriver à me retrouver dans le monde complexe des sphingolipides. Merci également à tous les membres passés et présent de l'équipe 4 du CRCT (la SL team), Stéphane, Camille, Patricia, Caroline, Florie, Fatima, Marine, Alexandre, Anne M., Anne S., Elie, Patricia, Delphine, Virginie, Joëlle, Justine, Thibault, Frédérique, Hervé, David, Julia, Karine, Carine. Vous avez contribué à faire de ma thèse un bon moment malgré les moments parfois difficiles de la recherche.

Je ne pourrais pas oublier de remercier mes collègues du secteur de cytométrie en flux du laboratoire d'hématologie, François, JB, Marie Laure, Martine, Jackie, Geneviève, Sophie, Sylvie et Sylvie, qui m'ont vu beaucoup moins à la fin de la thèse qu'au début. Travailler avec vous a été exceptionnel, je regrette de ne pas avoir pu rester avec vous pour la suite de ma carrière mais je pense que je vais quand même m'épanouir au laboratoire d'histocompatibilité de Nancy, même si je n'ai pas encore fini ma première semaine quand j'écris ces remerciements.

Je tenais à remercier également les Professeurs Pierre Sié et Eric Delabesse de m'avoir accueilli durant mon internat, puis pendant mon assistantat hospitalo-universitaire au sein du laboratoire d'hématologie du CHU de Toulouse. Merci de m'avoir permis de commencer une carrière universitaire même si elle va s'arrêter, tout du moins pour le moment.

Je voulais aussi remercier le Professeur Antoine Blancher, chef de service, et le Docteur Jean Tkaczuk, MCU-PH, au laboratoire d'immunologie du CHU de Toulouse de m'avoir transmis leur passion de l'immunologie et de la cytométrie en flux.

Je souhaitais également remercier le Docteur Alice Aarnink de m'avoir fait confiance en me proposant de venir au CHU de Nancy pour rejoindre le laboratoire d'histocompatibilité. Les premières semaines passées m'ont conforté dans cette nouvelle aventure hospitalière.

Merci à tous mes amis qui ont pu m'aider lors de ces 4 années de thèse, je ne peux pas énumérer tout le monde de peur d'en oublier ou sinon il me faudrait encore 3 pages de remerciements supplémentaires.

Merci à mes parents, mes frères et sœurs, mes beaux-frères et mes petites nièces de m'apporter du réconfort quand je vous vois. Je vais me rapprocher un peu de certains d'entre-vous maintenant, on va pouvoir passer un peu plus de temps ensemble.

Enfin, à ma femme Sandie, J'ai fini mes études, enfin, mais pour toi il t'en reste encore quelques années. Lors de ma précédente thèse, je te souhaitais de réussir la passerelle et nous n'étions pas encore mariés. Je sais que tu vas passer ta thèse de médecine un jour et j'espère dans la spécialité que tu voudras. Je serais toujours là pour te soutenir même à distance pour le moment.

Liste des abréviations

5-FU : 5-Fluorouracile
ABC : ATP-Binding-Cassette
Ac : Anticorps
ADN : Acide désoxyribo-Nucléique
ACR : American College of Radiology
ADCC : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
ADP : Adénosine bis-Phosphate
AIF : Apoptosis Inducing Factor
AICD : Activation induced cell death
AKT : Protéine Kinase B
ALDH : aldéhyde déshydrogénase
AMP : Adénosine mono-Phosphate
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
BAK : Bcl-2 antagonist/killer
BAX : Bcl-2 associated X protein
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
Bcl-xL : B-cell lymphoma extra-large
BCR : Récepteur des Cellules B
BRCA1 : Breast Cancer 1
C1P : Céramide-1-phosphate
CCIS : Carcinome canalaire *in situ*
CDase : Céramidase
CERK : céramide Kinase
CERS : Ceramide Synthase
CERT : céramide Transférase
c-FLIP : cellular FLICE-like inhibitory protein
CLIS : Carcinome lobulaire *in situ*
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COPII : coat *protein* complex II
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
CPE : céramide-phosphoéthanolamine
CSC : cellules souches cancéreuses
CST : cerebroside sulfotransferase
CTL : Lymphocyte T Cytotoxique
CTLA4 : Cytotoxin T-Lymphocyte Antigen-4
DAG : diacylglycérol
DC : Cellules Dendritiques
dhSM : dihydro-sphingomyéline
DISC : death inducing signaling complex
DR : death receptor, récepteur de mort
E2 : œstradiol
EAE : Encephalomyélite Autoimmune expérimentale
EDG : Endothelial Differentiation Gene
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tetra acétique
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
ER : Récepteur aux œstrogènes
ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinases

FADD : Fas-associated with death domain
FSC : Forward Scatter
HDAC : Histone Desacétylase
HER2 : Human Epidermal Growth factor receptor-2
HEV : High Endothelial Venules
HIF1- α : Hypoxia-Inducible Factor-1 α
HLA : Human Leukocyte Antigen
GalCer : galactosylcéramide
GC : Centre Germinatif
GlcCer : glucosylcéramide
GrzB : Granzyme B
GSL : glycosphingolipides
Ig : Immunoglobulines
IGFBP3 : insulin-like growth factor-binding protein-3
IL : Interleukine
ILT : Immunoglobulin-Like Transcript
IMC : indice de masse corporelle
IUCC : International Union of Cancer Control
KDSR : 3-céto-dihydrosphingosine réductase
KIR : Killer Immunoglobulin-like Receptor)
KLF2 : Krüppel-like Factor 2
LacCer : lactosylcéramide
LGL : large granular lymphocytes
LPP : Lipid Phosphate Phosphatase
LyT : lymphocyte T
LyB : Lymphocyte B
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MCF-7 : Michigan Cancer Foundation 7
MDA-MB : MD Anderson-Metastatic Breast
MDSC : Myeloid Derived Suppressor Cells
MMP : Matrix Metallo-Protease
mTOR : mammalian Target of Rapamycin
MZ : Zone marginale
NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF- κ B : Nuclear Factor Kappa B
NK : lymphocytes Natural Killer
NO : monoxyde d'azote
NOS : Not Otherwise Specified
ORM : Orosomucoide
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells
PHB2 : prohibitine 2
PD-1 : Programm Death 1
PDL1 : Programm Death Ligand 1
PKC : Protéine Kinase C
PLC : Phospholipase C
PMT : photomultiplicateur
PR : Récepteur à la Progestérone
RE : réticulum endoplasmique
S1P : Sphingosine-1-Phosphate
SGPP : Sphingosine-1-Phosphate Phosphatase

S1PR : récepteur à la S1P
Sa : Sphinganine
SEP : Sclérose en plaques
SL : sphingolipides
SM : Sphingomyéline
SMase : sphingomyélinases
SMS : sphingomyéline synthase
So : Sphingosine
SK ; sphingosine kinase
SPL : Sphingosine-1-Phosphate Lyase
Spns2 : Spinster homolog 2
SPT : Sérine Palmitoyltransférase
SSC : Side Scatter
STAT-3 : Signal Transducers and Activators of Transcription-3
TAM : Macrophages associés aux tumeurs
TCR : Récepteur des cellules T
TdT : Terminal Desoxyribonucleotidyl Transférase
Tfh : T follicular helper
TGF- β : Transforming Growth Factor- β
Th : lymphocyte T helper
TIL : Lymphocyte infiltrant les tumeurs
TNBC : cancer du sein triple négatif
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
TNM : Tumor, Node, Metastasis
TP53 : Tumor Protein 53
TRAF2 : TNF receptor-associated factor-2
TRAIL : tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand
Treg : Lymphocyte T régulateur
Trm : lymphocyte T résident-mémoire
VAP : vesicle-associated membrane-protein
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Table des matières

INTRODUCTION.....	14
A. Les sphingolipides.....	14
A.1 Structure des sphingolipides.....	14
A.2 Métabolisme des sphingolipides	14
A.2.1 Synthèse <i>de novo</i>	15
A.2.2 Transport du céramide dans l'appareil de Golgi	18
A.2.3 Phosphorylation du céramide en céramide-1-phosphate.....	19
A.2.4 Métabolisme de la sphingomyéline.....	19
A.2.5 Formation des glycosphingolipides et des gangliosides	20
A.2.6 Dégradation du céramide et de la sphingosine.....	21
A.3 Fonctions biologiques des sphingolipides.....	24
A.3.1 Rôle structural des sphingolipides.....	24
A.3.2 Rôle dans la signalisation cellulaire	25
A.3.2.1 Le Céramide.....	26
A.3.2.1.1 Rôle pro-apoptotique du céramide.....	26
A.3.2.1.2 Autres rôles du céramide	27
A.3.2.2 La S1P.....	28
A.3.2.2.1 Export de S1P	28
A.3.2.2.1.1 Structure des S1PR	29
A.3.2.2.1.2 Expression et fonctions des S1PR	30
A.3.2.2.2 Action intracellulaire	30
B. Le cancer du sein.....	32
B.1 Epidémiologie et intérêt du dépistage précoce du cancer du sein.....	32
B.2 Diagnostic.....	32
B.2.1 Imagerie.....	32
B.2.2 L'examen anatomo-pathologique.....	33
B.2.2.1 Types histologiques	33
B.2.2.2 Tumeurs malignes	33
B.2.2.2.1 Les carcinomes in situ.....	34
B.2.2.2.1.1 Le carcinome lobulaire in situ (CLIS)	34
B.2.2.2.1.2 Le carcinome canalaire in situ (CCIS).....	34
B.2.2.2.2 Les adénocarcinomes infiltrants	34
B.2.3 Classification des cancers du sein	35
B.2.3.1 Classification moléculaire intrinsèque et anomalies moléculaires	35
B.2.3.2 Classification immunohistochimique.....	37

B.2.3.3	Classification moléculaire des TNBC et récepteur aux androgènes	38
B.2.4	Bilan d'extension et classification TNM.....	38
B.3	Prise en charge	39
B.3.1	Chirurgie.....	39
B.3.2	Radiothérapie	39
B.3.3	Chimiothérapie	39
B.3.4	Hormonothérapie.....	40
B.3.5	Médecine personnalisée et nouvelles chimiothérapies.....	40
B.3.6	Immunothérapies	40
B.4	Sphingolipides et cancer du sein	41
B.4.1	Dosage de sphingolipides dans les cancers	41
B.4.2	Expression de SPL et SGPP	42
B.4.3	Expression des sphingosine-kinases et S1P	42
B.4.3.1	S1P et signalisation du récepteur aux œstrogènes	43
B.4.3.2	S1P et signalisation indépendante du récepteur aux œstrogènes	44
B.4.3.3	Action dépendante de SK2.....	45
B.4.3.4	Rôle sur les cellules souches cancéreuses.....	45
B.4.3.5	Rôle dans la néoangiogénèse et les métastases.....	46
B.4.3.6	Résistances aux chimiothérapies et radiothérapies	46
B.4.4	Céramide	47
B.4.4.1	Sphingomyélinases	47
B.4.4.2	Céramide synthases.....	48
B.4.4.3	Céramidases	48
B.4.4.4	Céramide kinase.....	49
B.4.4.5	Chimiothérapies, céramide et analogues de céramides.....	49
B.4.5	Glucosylcéramides et gangliosides	50
C.	Immunité antitumorale	53
C.1	Généralités.....	53
C.2	Réponse immunitaire et cancer du sein.....	55
C.2.1	Le microenvironnement tumoral.....	55
C.2.2	Impact pronostique des lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL)	56
C.2.3	Impact pronostique des sous population de TIL	56
C.2.3.1	Les lymphocytes T CD8 cytotoxiques	57
C.2.3.2	Les lymphocytes Th1	58
C.2.3.3	Les lymphocytes Th2.....	59
C.2.3.4	Les lymphocytes Treg.....	59
C.2.3.5	Les lymphocytes Th17	61

C.2.3.6	Les lymphocytes Tfh.....	61
C.2.4	Circulation des TIL dans les tumeurs.....	61
C.2.5	Immunothérapie dans le cancer du sein	62
C.2.5.1	Vaccins.....	62
C.2.5.2	Transfert adoptif de cellules T	62
C.2.5.3	Inhibiteurs de checkpoint immunitaires.....	63
C.2.5.4	Chimiothérapies immunogènes et immunothérapies	64
C.3	Sphingolipides et immunité.....	65
C.3.1	Céramide	65
C.3.1.1	Céramide et signalisation des Ly T.....	65
C.3.1.2	Céramide et Ly T CD4 ⁺	66
C.3.2	Glucosylcéramides	67
C.3.3	S1P et S1PR	67
C.3.3.1	Gradient de S1P	67
C.3.3.2	Récepteurs à la S1P.....	69
C.3.3.2.1	S1P/S1P1 et migration lymphocytaire T.....	69
C.3.3.2.2	S1P et survie des lymphocytes T naïfs	71
C.3.3.2.3	S1PR et activation des lymphocytes T.....	71
C.3.3.2.4	S1PR et polarisation lymphocytaire T	73
C.3.3.3	S1PR et lymphocytes T résidents mémoires.....	74
	OBJECTIF DE LA THESE.....	75
	MATERIEL ET METHODES	76
A.	Echantillons biologiques	76
B.	Isolement des leucocytes du sang périphérique (PBMC).....	76
C.	Lipidomique et spectrométrie de masse	76
D.	Digestion mécanique des échantillons tumoraux	77
E.	BCgenExMiner.....	76
F.	Cytométrie en flux.....	77
G.	Immunohistochimie.....	77
H.	Tri et stimulation des lymphocytes T	78
I.	PCR quantitative en temps réel	78
J.	Analyse statistiques	78
A.	Signature sphingolipidique des cancers du sein.....	79
A.1	Taux de sphingolipides totaux dans les cancers du sein	79
A.2	Taux de sphingolipides totaux en fonction des différents types de cancers du sein	80
A.3	Identification d'une signature sphingolipidique des TNBC.....	81
A.3.1	Corrélation entre les dosages de sphingolipides des tumeurs	81

A.3.2	Altérations des proportions de sphingolipides en -C16 :0 et -C24 :0 dans les cancers TNBC	81
A.3.3	Les sphingolipides en -C24:0 comme biomarqueur des TNBC.....	82
A.4	Méta-analyse : expression génique	87
A.4.1	Niveau d'expression des enzymes de la voie de synthèse des glycosphingolipides et de la sphingomyéline.....	87
A.4.2	Modifications de l'expression d'ARNm des enzymes de la famille des céramide synthases dans les TNBC	88
A.4.3	Modifications de l'expression d'ARNm des enzymes de la famille des ELOVL dans les TNBC	89
A.5	Conclusion de la signature sphingolipidique dans les cancers du sein	90
B.	Infiltrat de lymphocytes dans le cancer du sein	91
B.1	Stratégie d'analyse	91
B.2	Infiltrat lymphocytaire par type de cancer	91
B.3	Corrélation entre l'infiltrat de lymphocytes et les sphingolipides.	93
B.4	Topologie de l'infiltrat lymphocytaire CD8 ⁺	96
B.5	Diminution de l'expression des S1PR après activation lymphocytaire	97
B.6	Conclusion de la partie sphingolipides et réponse immunitaire.....	98
	DISCUSSION	100
A.	Première partie	100
B.	Deuxième partie	104
C.	Conclusion.....	109
D.	BIBLIOGRAPHIE	110
	ANNEXES	141

INTRODUCTION

A. Les sphingolipides

Les sphingolipides (SLs), comme les glycolipides et les stérols sont des constituants des membranes cellulaires et jouent un rôle important dans la perméabilité membranaire. Certains SLs peuvent aussi jouer le rôle de molécules biologiquement actives dans la signalisation cellulaire en tant que seconds messagers. La nature énigmatique des sphingolipides, nommés ainsi en référence au sphinx de la mythologie grecque, remonte non seulement à leur structure et métabolisme complexes, mais aussi aux fonctions biologiques qu'ils remplissent.

La famille des SLs comprend, entre autres, les glycosphingolipides (GSL), la sphingomyéline (SM) et la dihydro-sphingomyéline (dhSM), le céramide (Cer), le dihydro-céramide (dhCer), le ceramide-1-phosphate (C1P), la sphinganine (Sa), la sphingosine (So) et la sphingosine-1-phosphate (S1P).

A.1 Structure des sphingolipides

La base des principaux SLs est la sphingosine, une chaîne aliphatique de 18 carbones, insaturée entre les carbones 4 et 5, portant deux groupements hydroxyles (en position 1 et 3) et une fonction amine (en position 2). L'ajout d'un acide gras dont la longueur de chaîne peut être variable sur le carbone 2 par une liaison amide donne le céramide et ses dérivés. Pour la sphingomyéline, on retrouvera un groupement phosphorylcholine ajouté sur la fonction alcool primaire du carbone 1 du céramide (Futerman et Hannun, 2004) (Figure 1).

A.2 Métabolisme des sphingolipides

Le céramide est l'élément central du métabolisme des SLs. Il peut être produit soit par synthèse *de novo*, soit provenir de la transformation d'autres SLs. Il va également être au départ de la synthèse des autres SLs. Il existe plus de 40 enzymes intervenant dans la biosynthèse des sphingolipides, dont la localisation tissulaire et subcellulaire peut varier.

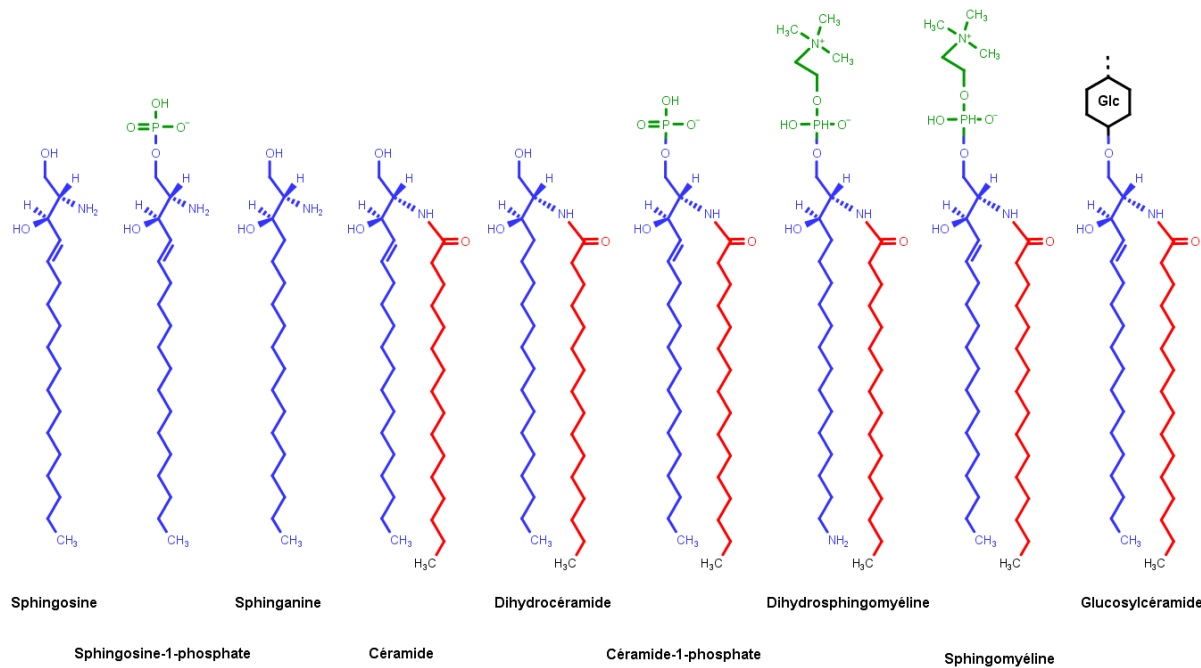


Figure 1

Structure des principaux sphingolipides. La base sphingoïde est colorée en bleu dans les différents schémas. L'acide gras conjugué est représenté en rouge. La partie polaire phosphate ou phosphorylcholine est de couleur verte. La glycosylation des sphingolipides est représentée en noir dans l'exemple du glucosylcéramide (GlcCer). Ne sont pas représentés dans cette figure les glycosphingolipides complexes dérivant du GlcCer.

A.2.1 Synthèse *de novo*

La synthèse *de novo* des sphingolipides se produit dans le réticulum endoplasmique (RE) et éventuellement dans les membranes associées aux RE telles que la membrane périméridienne et les membranes associées aux mitochondries. Ils sont synthétisés à partir de précurseurs non-sphingolipides qui sont la sérine et le palmitoyl-Coenzyme A (palmitoyl-CoA) (Figure 2).

La condensation d'une sérine et d'un palmitoyl-CoA va former la 3-céto-sphinganine grâce à l'action d'une Sérine PalmitoylTransférase (SPT). La SPT est une enzyme formée de plusieurs sous-unités dont SPTLC1 et SPTLC2 ou plus rarement de SPTLC1 et SPTLC3. SPTLC3 favoriserait la production de bases sphingoïdes à 16 carbones au lieu de 18 (Hornemann et al., 2009). La SPT est associée à une autre petite sous-unité activatrice ssSPTa ou ssSPTb qui augmente son activité catalytique. Les protéines de la famille des ORM dont il existe 3 gènes différents chez l'Homme, *ORMDL1/2/3*, interagissent avec la SPT et régulent négativement la synthèse *de novo* des sphingolipides (Siow et Wattenberg, 2012).

La 3-céto-sphinganine est ensuite réduite rapidement en sphinganine (Sa) (ou dihydrosphingosine) en présence de NADPH par la 3-céto-dihydro-sphingosine réductase (KDSR) (Kihara et Igarashi, 2004). La Sa va ensuite être transformée en dihydro-céramide (dhCer) après ajout d'un acyl-CoA par une céramide synthase (CERS1-6) codée par les gènes *CERS1*

à *CERS6* au niveau de l'amine libre en C2 de la Sa. Il existe une certaine spécificité des différentes CERS vis-à-vis de l'acyl-CoA utilisé. Par exemple, *CERS5* et *CERS6* vont plutôt synthétiser du C14 ou C16 dhCer tandis que *CERS2* formera plutôt du C20 à C26 dhCer. L'expression des CERS sera aussi variable selon le type de tissus (Tableau 1). En général, l'expression de *CERS2* est généralement plus forte que les autres (Levy et Futerman, 2010).

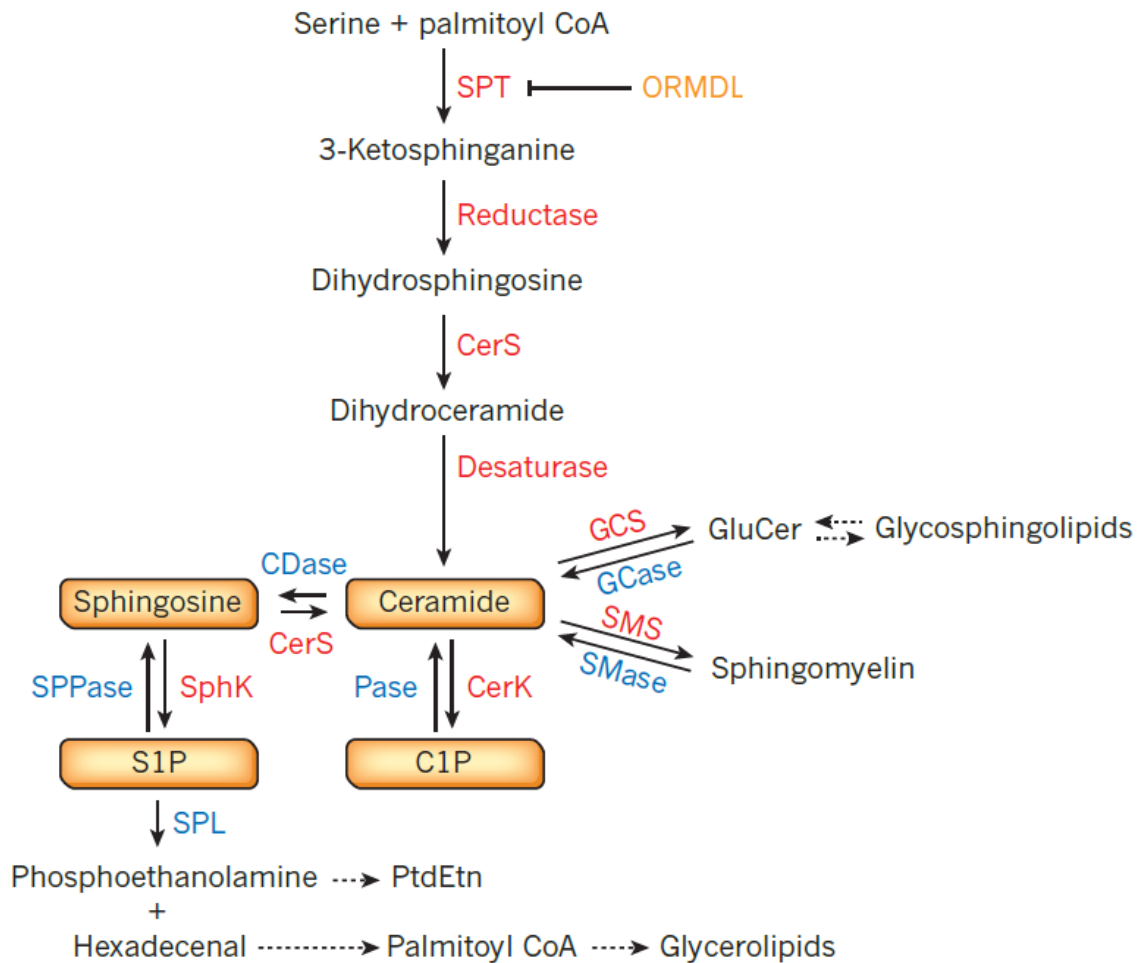


Figure 2

Schema simplifié de la synthèse des sphingolipides. La voie de synthèse *de novo* commence par l'action de la sérine palmitoyltransférase (SPT), dont l'action est régulée négativement par les ORMDL. Les réactions enzymatiques suivantes aboutissent à la formation de céramide puis de la sphingomyéline et des glycosphingolipides. Les céramides peuvent être métabolisés en d'autres espèces de lipides bioactifs par la phosphorylation en céramide-1-phosphate (C1P) par la Céramide kinase (CERK), ou hydrolysé en sphingosine qui est ensuite phosphorylé en sphingosine-1-phosphate (S1P) par les sphingosine kinases (SphKs). La S1P peut être déphosphorylée par des phosphatases en sphingosine ou dégradée par la lyase (SPL) en phosphoethanolamine et en hexadécanal. Les enzymes dégradant les sphingolipides sont en bleues en celle qui les réutilisent dans la voie de sauvetage sont en rouge également même si ces réactions ont lieu dans de compartiments cellulaires différents. CDase, ceramidase ; CerS, ceramide synthase ; GCCase, glucosylceramidase ; GCS, glucosylceramide synthase ; Pase, phosphatase ; PtdEtn, phosphatidylethanolamine ; SMase, sphingomyelinase ; SMS, sphingomyeline synthase ; SPPase, sphingosine-1-phosphate phosphatase. (D'après Maceyka et Spiegel, 2014)

Tableau 1

Récapitulatif de localisations tissulaire préférentielle des différentes Céramide synthases et spécificité vis-à-vis des acyl-CoA utilisés en fonction de la longueur de la chaîne carbonée.

Céramide synthase	Acyl-CoA	Distribution tissulaire
CERS1	C18	Cerveau (neurones), muscles
CERS2	C20-C24	Cerveau (oligodendrocytes), foie, poumons, intestins, reins, tissu adipeux
CERS3	C18 ; \geq C26	Peau, testicules
CERS4	C18-C22	Cœur, peau
CERS5	C14-C16	Prostate, muscles
CERS6	C14-C16	Intestins, ganglions, glomérules rénaux, hippocampe

Les acyl-CoA peuvent avoir plusieurs origines. Les acyl-CoA saturés proviennent de la synthèse endogène des acides gras. L'élongation des acides gras pour passer au-delà du C16 : requiert l'action des élongases.

Il existe 7 élongases humaines codées par les gènes *ELOVL1-7*. L'élongation du palmitoyl-CoA (C16:0) en stéaroyl-CoA (C18:0) est réalisée par *ELOVL6*. Le stéaroyl-CoA peut être désaturé en oléicoyl-CoA (C18:1) par l'action de SCD-1, une Δ 9-désaturase. L'élongation des chaînes C20 à C24 et au-delà du stéaroyl-CoA ou de l'oléicoyl-CoA va dépendre des élongases codées par *ELOVL1*, 3 et 7 (Guillou et al., 2010). L'utilisation d'une SiRNA contre CERS2 réduit l'activité élongase vers les acyl-CoA en C20:0 et C22:0, ce qui montre le lien étroit entre l'activité élongase et la synthèse des sphingolipides (Ohno et al., 2010).

L'action d'une Δ 4-désaturase (DES1 ou DES2), codée par 2 gènes différents *DEGS1* et *DEGS2*, permet d'obtenir du céramide à partir du dihydro-céramide en créant une insaturation entre les carbones C4 et C5 de la chaîne aliphatique sphingoïde (Ternes et al., 2002 ; Mizutani et al., 2004). Une petite partie du céramide contenu dans le RE pourra être transformé en céramide-phosphoéthanolamine (CPE) par une enzyme appelé SMSr, pour « sphingomyelin synthase related » (Vacaru et al., 2009). La plupart du céramide sera utilisé pour la synthèse des autres sphingolipides en majorité dans l'appareil de Golgi.

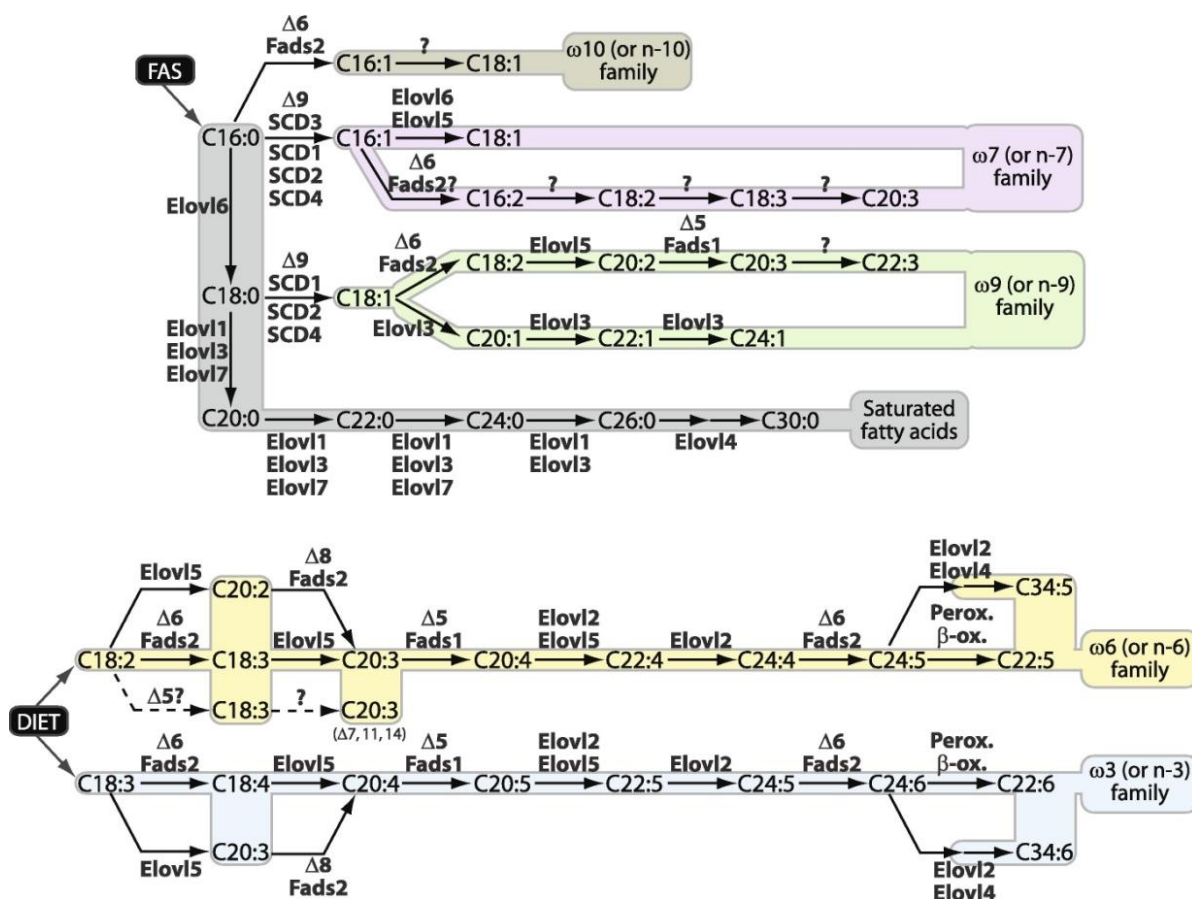


Figure 3
Schéma récapitulatif de l'élongation des acides gras. La partie supérieure représente l'élongation des acides gras provenant de la synthèse endogène. La partie inférieure représente l'élongation des acides gras de la famille n-3 et n-6 apportés par l'alimentation. (D'après Guillou et al., 2010)

A.2.2 Transport du céramide dans l'appareil de Golgi

Le céramide étant insoluble dans l'eau, son transport vers l'appareil de Golgi va se faire par un mécanisme vésiculaire dépendant de la protéine COPII ou par l'intervention d'un transporteur monomérique du céramide, la protéine CERT (« ceramide transfer protein »).

Le transport vésiculaire permet d'apporter du céramide qui va se retrouver au niveau du cis-Golgi orienté côté cytosolique. Cependant, le blocage de la formation de vésicules de transport n'inhibe que partiellement la synthèse de dérivés du céramide en dehors du RE (Funato et Riezman, 2001). Le transport du céramide vers le RE par la CERT requiert la consommation d'ATP et permet d'adresser le céramide vers le trans-Golgi. La CERT interagit avec le RE *via* un motif FFAT qui lui permet d'interagir avec la protéine VAP située dans le RE ; son domaine START, d'environ 230 acides aminés dans sa partie C-terminale, joue le rôle d'extracteur de céramide de la membrane du RE ; un domaine PH (« Pleckstrin Homology »), en N-terminal, permet de reconnaître le phosphatidylinositol-4 monophosphate (PtdIns4P) qui est enrichi dans le trans-Golgi ; enfin une partie centrale riche en sérine

pourrait être phosphorylée (Hanada et al., 2003). Le céramide peut facilement effectuer un « flip-flop » spontané du feuillet externe vers le feuillet interne de la membrane de l'appareil de Golgi et ainsi être utilisé par des enzymes localisées dans la partie luminale de l'appareil de Golgi.

A.2.3 Phosphorylation du céramide en céramide-1-phosphate

Le céramide peut être phosphorylé en céramide-1-phosphate (C1P) par la céramide kinase (CERK) dont le clonage du seul gène identifié a été effectué en 2002 (Sugiura et al., 2002). La CERK est une enzyme qui est localisée au niveau de la membrane plasmique, et de vésicules intracellulaires, mais son domaine PH lui donne une localisation préférentielle au niveau du trans-Golgi. Son activation dépend du calcium et de la calmoduline ainsi que de sa phosphorylation au moins au niveau de la Ser³⁴⁰. Elle utilise le céramide provenant de la dégradation de la sphingomyéline au niveau de la membrane plasmique, ou le céramide apporté par la CERT dans l'appareil de Golgi (cf. chapitre A.2.4). En revanche, elle utilise peu le céramide provenant de la dégradation des glycosphingolipides. Le C1P formé peut être transporté par un transporteur spécifique CPTP (« Ceramide-1-phosphate transfer protein ») entre les différentes membranes cellulaires. La CPTP est localisée dans le cytoplasme et s'associe avec le trans-Golgi et les membranes périnucléaires mais n'est pas associée aux lysosomes ni au RE (Bornancin, 2011).

A.2.4 Métabolisme de la sphingomyéline

Le céramide peut être transformé en sphingomyéline par une sphingomyéline synthase (SMS). Il existe 2 SMS, SMS1 et SMS2, respectivement codées par les gènes *SGMS1* et *SGMS2* (Huitema et al., 2004). Ces enzymes catalysent le transfert de la phosphocholine à partir de la phosphatidylcholine sur le céramide, permettant de générer de façon concomitante du diacylglycérol (DAG) et de la sphingomyéline (Yeang et al., 2008). Tandis que les deux SMS sont localisées dans l'appareil de golgi, la SMS2 est aussi localisée au niveau de la membrane plasmique (Tani et Kuge, 2009). La sphingomyéline formée au niveau du trans-Golgi va être véhiculée par transport vésiculaire vers la membrane plasmique où elle se retrouve majoritairement au niveau du feuillet externe, dans les microdomaines membranaires (Duran et al., 2012). La sphingomyéline est le sphingolipide majoritaire dans les cellules ; elle peut servir de substrats aux sphingomyélinases (SMases) qui permettent de générer du céramide et de la phosphocholine. Il existe plusieurs SMases qui peuvent être classées selon

leur pH optimal de réaction en SMase acide, neutre ou alcaline. Le gène *SMPD1* code pour 2 isoformes de la SMase acide, dont l'une peut être lysosomale, l'autre, sécrétée. Les gènes *SPMD2* à *SMPD5* codent respectivement pour des SMases neutres (nSMases) 1, 2, 3 et la SMase associée aux mitochondries (MA-SMase). Les nSMases 1 et 3 sont principalement localisées dans le RE et dans l'appareil de Golgi, la MA-SMases dans le RE et les mitochondries tandis que la nSMase 2 est plutôt située à la membrane plasmique. La localisation subcellulaire des différentes SMases conditionne leurs fonctions biologiques. Par exemple, dans les lysosomes, le céramide généré par la SMase acide est catabolisé par la céramidase acide en sphingosine qui pourra sortir du lysosome pour être métabolisée en divers sphingolipides. Au niveau de la membrane plasmique, la SMase acide sécrétée permet d'hydrolyser la sphingomyéline du feuillet externe, facilitant le regroupement (clustering) de récepteurs comme Fas (CD95) ou CD40 (Cremesti et al., 2001 ; Grassme et al., 2002). A ce jour, parmi les SMases, seule la nSMase 2 a été identifiée comme jouant un rôle important dans la formation des exosomes dans les corps multivésiculaires (Trajkovic et al., 2008). Enfin, il existe une SMase alcaline, codée par le gène *ENPP7*, qui a une localisation intestinale et sert essentiellement à dégrader la sphingomyéline exogène provenant de l'alimentation. Tandis que les SMases codées par *SMPD1-5* ont une activité phosphodiesterase, permettant l'hydrolyse de sphingomyéline en céramide, la SMase alcaline a une activité duale nucléotide-pyrophosphatase et phosphodiesterase (Bienias et al., 2016).

A.2.5 Formation des glycosphingolipides et des gangliosides

La formation des gangliosides, des sphingolipides complexes souvent sialylés, a aussi comme origine le céramide. La première étape a lieu au niveau du cytosol du cis-Golgi avec l'action d'une glucosylcéramide synthase, codée par le gène *UGCG* (UDP-Glucose Ceramide Glucosyltransferase), qui permet la formation du glucosylcéramide (GlcCer) (Ichikawa et al., 1996). Le GlcCer va ensuite être transporté par la protéine FAPP2 qui possède aussi un domaine de reconnaissance des PtdIns4P vers le trans-Golgi (D'Angelo et al., 2007). Dans l'appareil de Golgi, l'ajout d'un galactose au GlcCer par 2 galactosyltransférases, respectivement codées par les gènes *B4GALT5* et *B4GALT6*, permet la synthèse du lactosylcéramide (LacCer) (Tokuda et al., 2013). A partir du LacCer, plusieurs séries de gangliosides peuvent être synthétisées. Tandis que les gangliosides de la série 0 ne sont pas sialylés sur le galactose, les séries a, b et c portent respectivement une, 2 et 3 sialylations sur le galactose. Les gangliosides sont des constituants majoritairement retrouvés dans le système

nerveux central, exclusivement localisés sur le feuillet externe de la membrane plasmique. Plusieurs enzymes entrent en jeu dans la synthèse des gangliosides (Figure 4).

De manière analogue au GlcCer, il existe une autre voie de synthèse dans le RE qui permet de convertir le céramide en galactosylcéramide (GalCer) grâce à l'action d'une UDP-galactosyltransférase codée par le gène *UGT8* (Bosio et al., 1996). Le GalCer peut ensuite être métabolisé en glycosphingolipides plus complexes, dont le sulfatide par l'action d'une cerebroside sulfotransférase (CST), codé par *GAL3ST1* dans l'appareil de Golgi (Honke et al., 1997).

Il existe de la même façon que pour la sphingomyéline un recyclage et une voie de sauvetage du céramide utilisant les gangliosides (Figure 2). Les gangliosides présents à la membrane plasmique sont internalisés dans des vésicules lumineales puis dégradés dans les lysosomes par des sialidases, puis des galactosidases et des hexosaminidases. La dernière étape étant la dégradation du GlcCer en céramide par la glucosylcéramidase codée par *GBA1* et 2. La régulation de la dégradation des gangliosides fait intervenir des saposines (SAP) et du di(monoacylglycero)phosphate (Kolter et Sandhoff, 2005). La dégradation du galactosylcéramide en céramide se fait quand a elle par l'action d'une galactosylcérébroside (GALC) (Luzi et al., 1995).

A.2.6 Dégradation du céramide et de la sphingosine

Le céramide peut être dégradé par plusieurs enzymes appelées céramidases (CDases) avec différentes localisations subcellulaires et caractéristiques biochimiques. La céramidase acide, la plus étudiée, codée par le gène *ASAHI*, a une localisation endosomale ; la céramidase neutre, codée par *ASAH2*, est localisée à la membrane plasmique ; les céramidases alcalines, codées par 3 gènes (*ACER1*, *ACER2* et *ACER3*) se retrouvent dans le RE ou l'appareil de Golgi (Coant et al., 2017). Le résultat de l'action de ces enzymes est la formation de sphingosine (So). Les souris *ACER1*^{-/-} développent des maladies de peau et des phanères (Liakath-Ali et al., 2016); Les souris *ACER2*^{-/-} ont de leur côté une baisse de la production de So, Sa, S1P et de dhS1P, dans le compartiment hématopoïétique plus particulièrement (Li et al., 2018).

La So peut être substrat des céramide synthèses (CERS) permettant la re-synthèse de céramide et des sphingolipides complexes dans la voie dite de sauvetage. Alernativement, la So peut être phosphorylée sur sa fonction amino-alcool pour former la S1P par l'action des sphingosine kinases, SK1 et SK2, codées respectivement par les gènes *SPHK1* et *SPHK2*. La

structure de ces 2 enzymes diffère avec notamment la présence d'une séquence de localisation nucléaire sur la SK2, mais pas sur SK1. Ceci explique la localisation préférentielle de SK2 dans le noyau et de SK1 dans le cytoplasme (Baker et al., 2013). Les souris avec un double KO complet de *Sphk1* et *Sphk2* ne sont pas viables (Mizugishi et al., 2005).

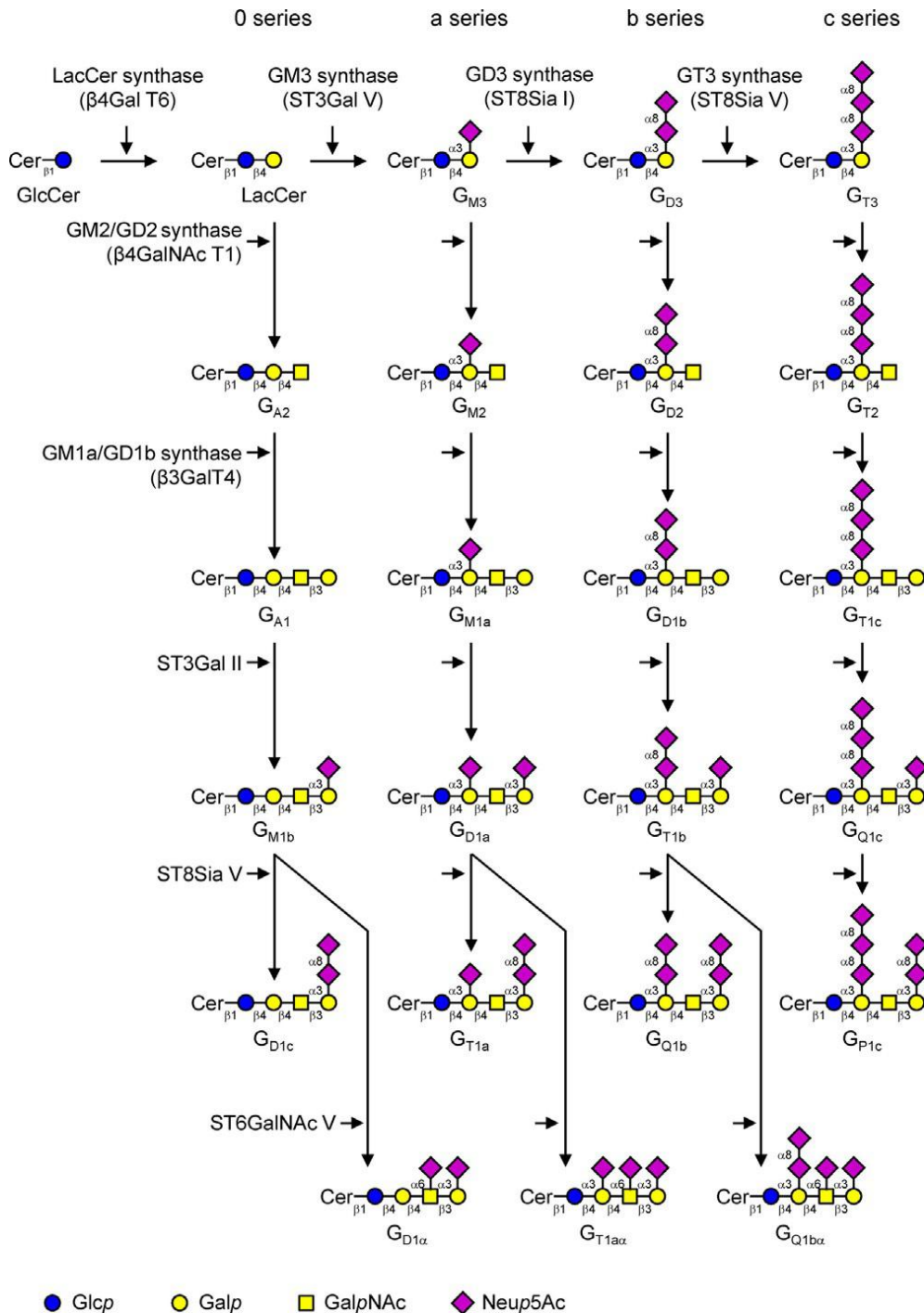


Figure 4
Synthèse des gangliosides. Schéma récapitulatif de la synthèse des gangliosides à partir du GlcCer. La nomenclature des différents gangliosides est réalisée selon Svennerholm, 1994 (D'après Groux-Degroote et al., 2017)

La S1P peut être recyclée en So sous l'action d'une S1P phosphatase (S1PPase), dont il existe 2 isoformes, codées par les gènes *SGPP1* et *SGPP2*. Cette voie participe aussi à la voie de sauvetage du céramide (Le Stunff et al., 2002 ; Ogawa et al., 2003). La S1P peut aussi être dégradée de façon irréversible en hexadécénal et phosphoéthanolamine par une enzyme appelée S1P Lyase (SPL), codée par le gène *SGPL1* (Zhou et Saba, 1998). La S1P peut être sécrétée *via* des transporteurs de la famille ABC et/ou par Spns2. La S1P extracellulaire peut aussi être déphosphorylée par des lipides phosphatases (Figure 5).

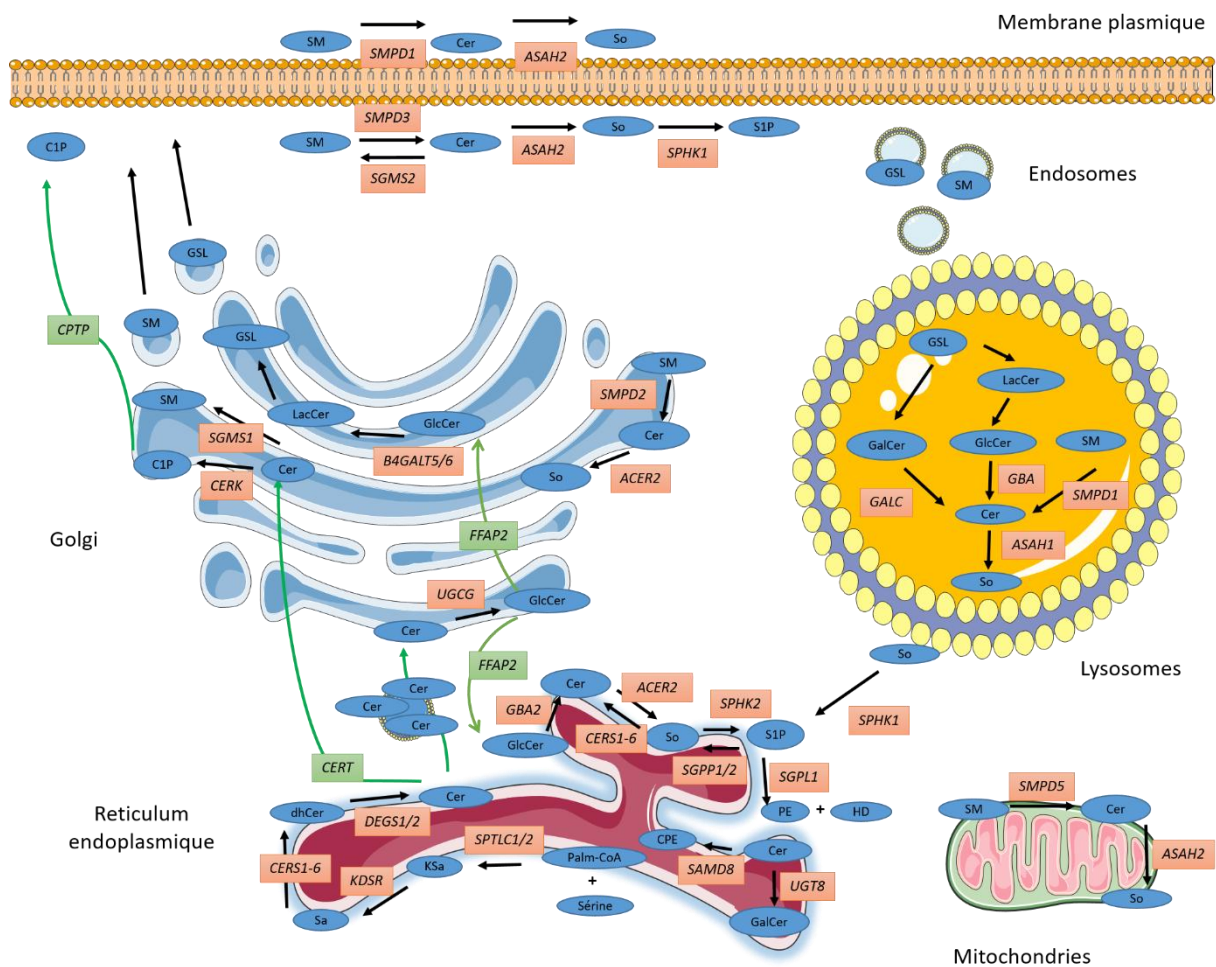


Figure 5

Métabolisme des SLs. La synthèse cellulaire et la dégradation des sphingolipides impliquent plusieurs enzymes, certaines isoformes avec des propriétés biochimiques et des localisations cellulaires différentes. La synthèse *de novo* du céramide (Cer) a lieu dans le RE. Le Cer est ensuite transporté dans l'appareil de Golgi et transformé en glycosphingolipides (GSL) ou en sphingomyéline (SM). La dégradation de la SM peut être réalisée à la membrane plasmique, dans l'appareil de Golgi, les lysosomes ou les mitochondries. La dégradation des GSL se fait dans les lysosomes ou dans le RE. So, sphingosine; Sa, Sphinganine; KSa, 3-Céto-sphinganine; CPE, céramide phosphate-éthanolamine; PE, céramide phospho-éthanolamine; HD, hexadécénal; S1P, Sphingosine-1-phosphate; C1P, Céramide-1-phosphate; dhCer, dihydro-Céramide; GalCer, galactosylcéramide; GlcCer, glucosylcéramide; LacCer, lactosylcéramide.

A.3 Fonctions biologiques des sphingolipides

Les sphingolipides sont des constituants cellulaires majeurs dont certains vont jouer un rôle structural, tandis que d'autres vont avoir des rôles plus spécifiques en tant que second messenger ou modulateur de la signalisation cellulaire. Ils sont impliqués dans diverses fonctions comme la migration, la prolifération, l'adhésion, l'activation, la différenciation et la mort cellulaire. Le rôle des sphingolipides en cancérologie mammaire et en immunologie sera décrit ultérieurement.

A.3.1 Rôle structural des sphingolipides

La sphingomyéline et le céramide sont des constituants majeurs des membranes cellulaires. La membrane plasmique est constituée d'une bicouche lipidique composée de cholestérol, de sphingolipides et de phospholipides. La partie hydrophobe des lipides est orientée vers le centre de la bicouche, tandis que les parties polaires des lipides sont exposées, soit vers l'environnement extracellulaire, soit vers le cytosol.

Le maintien de l'intégrité et de la polarité de la membrane plasmique est essentiel à la survie cellulaire. Les sphingolipides de la membrane plasmique sont majoritairement localisés sur le feuillet externe de la bicouche lipidique. Ils peuvent plus ou moins facilement changer de feuillet par un mécanisme de « flip-flop » ; le céramide étant très hydrophobe, il est plus à même de réaliser ce flip-flop que les sphingolipides possédant une tête polaire (Contreras et al., 2005). Un enrichissement en C16:0-céramide dans la membrane plasmique rendrait la membrane plus perméable en permettant ainsi l'entrée ou la sortie de molécules (Siskind et Colombini, 2000 ; Siskind et al., 2006). Il a été décrit que l'activation d'une SMase transformant la sphingomyéline en céramide pouvait même permettre l'apparition de pores dans une membrane plasmique ou mitochondriale et participer aux mécanismes d'apoptose en dehors de la voie intrinsèque ou extrinsèque (Lopez-Montero et al., 2007). L'équilibre entre les différents sphingolipides, surtout SM et céramide, participe aussi à la rigidité et à la fluidité membranaire, ce qui en fait également un facteur jouant dans la migration cellulaire (Sitrin et al., 2011). Au niveau membranaire, le céramide est aussi impliqué dans la formation de vésicules extracellulaires (comme les exosomes) ou des cavéoles (Verderio et al., 2018).

Le céramide et la sphingomyéline peuvent former des associations avec le cholestérol et constituer ainsi des radeaux lipidiques à la membrane plasmique (Simons et Ikonen, 1997). Cette propriété des SLs à s'associer à d'autres lipides est liée à la présence de parties donneuses ou accepteuses de liaisons hydrogènes (Garcia-Arribas et al., 2016). Les radeaux

lipidiques ou « raft » sont des microdomaines de moins de 200 nm enrichis en cholestérol et en une ou plusieurs familles de sphingolipides. Ces rafts seraient capables de se déplacer sur la membrane plasmique et la formation de ces rafts semblent essentielle à la signalisation de certains récepteurs membranaires. Par exemple, le déficit en SMS1, enzyme majeure pour la synthèse de sphingomyéline, a été décrit comme altérant le recrutement de Fas/CD95 dans les rafts, diminuant la signalisation apoptotique en réponse à l'engagement de ce récepteur de mort (Miyaji et al., 2005). De plus, la signalisation activatrice de lymphocytes T (Ly T) CD4 en réponse à une stimulation polyclonale est inhibée *in vitro* et *in vivo* par le déficit en SMS1, illustrant l'importance de la sphingomyéline et des microdomaines membranaires dans l'activation lymphocytaire (Jin et al., 2008 ; Dong et al., 2012).

Les glycosphingolipides sont aussi impliqués dans la formation des membranes et des micro-domaines. Au niveau de la membrane plasmique, ils sont exclusivement localisés sur le feuillet externe et leurs groupements oligosaccharidiques contribuent à la formation du glycocalyx. Certains gangliosides jouent également un rôle dans la modulation de la signalisation de l'EGFR en favorisant l'oligomérisation de ces récepteurs (Coskun et al., 2011).

Les sphingolipides à chaînes longues sont enrichis au niveau cutané où ils contribuent à l'établissement d'une barrière hydrophobe. Ceci s'explique notamment par l'augmentation de l'expression de certaines isoformes de céramide synthases au niveau de l'épiderme. Par exemple, lors de la différenciation des kératinocytes, il y'a une augmentation de l'expression de *CERS3* qui favorise la production de céramides à chaînes très longue et ultra-longues (Jennemann et al., 2012). Ces céramides, très hydrophobes, se lient à des protéines et participent à la formation et à l'imperméabilisation de la couche cornée (Marekov et Steinert, 1998).

A.3.2 Rôle dans la signalisation cellulaire

Certains sphingolipides peuvent avoir une action directe dans la signalisation cellulaire, en agissant comme ligands de récepteur ou seconds messagers. De plus, au travers de leurs propriétés physicochimiques, ils peuvent indirectement moduler l'activation de voies de signalisation via notamment la régulation de la fluidité membranaire. Parmi les sphingolipides biologiquement actifs dans la signalisation, le céramide et la S1P sont les plus étudiés de par leur rôle opposé dans la croissance cellulaire. Tandis que le céramide induit l'apoptose (Obeid et al., 1993), la S1P est anti-apoptotique (Cuvillier et al., 1996). En

cancérologie, un faisceau d'arguments suggère que le céramide est un anti-oncométabolite et que la S1P est un oncométabolite. L'équilibre entre ces 2 lipides a ainsi été appelé « rhéostat sphingolipidique », et des dérégulations de cet équilibre sont fréquemment décrites dans le cancer.

A.3.2.1 Le Céramide

Le céramide a depuis longtemps été impliqué dans les processus d'apoptose (Obeid et al., 1993), et plus récemment, dans d'autres types de mort cellulaire comme la nécroptose (Zhang et al., 2018), et d'autres mécanismes biologiques comme l'inhibition de la prolifération cellulaire (Jayadev et al., 1995) et l'induction d'autophagie (Scarlati et al., 2004).

A.3.2.1.1 Rôle pro-apoptotique du céramide

Le céramide joue un rôle dans l'induction de l'apoptose par la voie intrinsèque ou extrinsèque. Divers stimuli activateurs de la voie intrinsèque, c'est-à-dire de la voie mitochondriale de l'apoptose, comme les UV, les radiations ionisantes et les molécules de chimiothérapies, induisent une augmentation du taux intracellulaire de céramide. De même, la voie extrinsèque de l'apoptose, activée par les ligands (comme TNF α , FasL/CD95L et TRAIL) de récepteurs de mort (DR) (TNF-R1, Fas/CD95, TRAIL-R1/DR4 et TRAIL-R2/DR5), augmente la production de céramide. La signalisation des récepteurs de mort (CD95, DR4 et DR5) implique leur oligomérisation à la surface cellulaire, le recrutement de FADD et de la pro-caspase-8 pour former le complexe de signalisation induisant la mort (DISC), puis l'activation de la caspase-8 et le déclenchement de l'apoptose en aval. La signalisation des DR induit l'activation de la SMase acide (Cifone et al., 1994 ; Dumitru et Gulbins, 2006 ; Stephan et al., 2017) ce qui entraîne une augmentation du taux de céramide membranaire facilitant ainsi l'oligomérisation des DR (Cremesti et al., 2001), notamment dans les micro-domaines (Miyaji et al., 2005). Toutefois, il est à noter que le rôle de la SMase acide dans la signalisation de Fas reste controversé (Cock et al., 1998 ; Bezombes et al., 2001), suggérant l'existence de mécanismes alternatifs de production de céramide comme l'activation d'une SMase neutre ou l'inhibition de la SMS1 en réponse à FasL/CD95L (Lafont et al., 2010 ; Lafont et al., 2012).

D'autres mécanismes conduisant à la mort cellulaire en réponse au céramide ont été décrits. Par exemple, le céramide peut inactiver la protéine AKT et diminuer notamment

l'expression de cFLIP, une protéine inhibitrice de la caspase-8 (Nam et al., 2002 ; Yoon et al., 2002 ; Zhao et al., 2013). La production de céramide au niveau membranaire peut aussi s'accompagner d'une accumulation de céramide dans les mitochondries. Cet excès de céramide mitochondrial entraîne la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP) et agit avec la protéine pro-apoptotique BAX pour induire le relargage de cytochrome c (Siskind et al., 2006). De plus, le céramide peut induire le recrutement mitochondrial de la PKC δ et par la suite le relargage de cytochrome c et l'activation de la caspase 9 (Sumitomo et al., 2002). Il est à noter que le groupe du Dr. Green a montré que des catabolites du céramide pouvaient contribuer à la MOMP. Ainsi, la S1P et l'hexadécaneal, catabolite de la S1P généré par la S1P lyase, facilitent respectivement l'oligomérisation de BAK et de BAX (Chipuk et al., 2012). Enfin, l'augmentation de céramide mitochondrial semble aussi impliquée dans l'induction d'apoptose indépendante de l'activation des caspases 3/7 par un mécanisme dépendant de la protéine AIF (Scharstuhl et al., 2009).

A.3.2.1.2 Autres rôles du céramide

L'autophagie peut faciliter la survie cellulaire, en condition de carence nutritionnelle par exemple, ou, *a contrario*, conduire à la mort cellulaire programmée de type 2, dans le cas d'un excès d'autophagie. Le céramide, par l'inhibition d'AKT et l'augmentation de l'expression de Beclin-1, peut aussi induire l'autophagie (Scarlati et al., 2004). D'autres mécanismes ont été décrits dans l'induction de l'autophagie par l'accumulation de céramide conduisant à l'activation de LC3B, ATG1, ATG5 ou ATG7. Il semble que ce soit l'accumulation de céramide en C14 et C16 qui entraîne l'autophagie (Spassieva et al., 2009). Le C18-céramide, quant à lui, peut induire de la mitophagie et conduire à la mort cellulaire (Sentelle et al., 2012). Il est à noter que le dihydrocéramide est lui aussi capable d'induire de l'autophagie (Hernandez-Tiedra et al., 2016).

L'accumulation de céramide peut moduler le cycle cellulaire. Le céramide peut bloquer la transition en phase G1/S ou G2/M (Rani et al., 1995) Le dihydrocéramide a également été relié à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S (Gagliostro et al., 2012). Ces modulations du cycle cellulaire sont dépendantes de l'inhibition des protéines CDK (cycle-dependent kinases) ou de l'activation des CKI (« CDK inhibitors »), protéines inhibitrices des CDK : p21 et/ou p27.

A.3.2.2 La S1P

Les fonctions biologiques associées à la S1P comprennent, entre autres, la prolifération, la migration, la survie cellulaire et le contrôle de l'homéostasie tissulaire. Son action, initialement décrite comme autocrine ou paracrine, est associée à des récepteurs membranaires. Son rôle en tant que second messenger intracellulaire a été évoqué plus tardivement.

A.3.2.2.1 Export de S1P

La S1P est présente en grande quantité dans la circulation sanguine alors que sa synthèse est principalement intracellulaire. Sa structure polaire ne lui permet pas de traverser directement la bicouche lipidique de la membrane plasmique par diffusion passive. L'export de S1P est effectué par 2 types de transporteurs. Les premiers transporteurs identifiés sont des transporteurs de type ABC (ATP binding cassette). Ces transporteurs, peu spécifiques, sont différents en fonction des types cellulaires produisant la S1P. Les 2 principaux transporteurs de S1P décrits sont ABCA1 et ABCC1 ; ABCA7 présent dans les plaquettes peut aussi transporter de la S1P. L'inhibition de ces transporteurs n'est pas pour autant un frein à l'export de S1P. L'avancée majeure dans la compréhension des mécanismes d'export de la S1P a été l'identification de spinster homolog 2 (Spns2), un transporteur spécifique de la S1P (Kawahara et al., 2009). Sa structure n'est pas encore complètement connue mais il ne semble pas avoir besoin d'ATP pour transporter la S1P.

L'action extracellulaire de la S1P est dépendante de la stimulation de récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G, les récepteurs à la S1P (S1PR), numérotés de 1 à 5 (S1P1 à S1P5). Les différentes protéines G couplées à ces récepteurs varient en fonction des types cellulaires et leur stimulation peut avoir un rôle différent en fonction de la cellule stimulée. Ces récepteurs ont des fonctions biologiques variées mais ils sont primordiaux dans la régulation du système cardio-vasculaire, immunitaire et nerveux (**Figure 6**).

L'expression des 3 premiers récepteurs est largement répandue dans presque tous les types cellulaires. L'expression de S1P4 et S1P5 est plutôt restreinte à certains types cellulaires. Le gène *S1PR1*, codant pour S1P1 est localisé sur le chromosome 1, tandis que les gènes *S1PR2*, *S1PR3*, *S1PR4*, *S1PR5* codant respectivement pour S1P2, 3, 4 et 5 sont situés sur le chromosome 9.

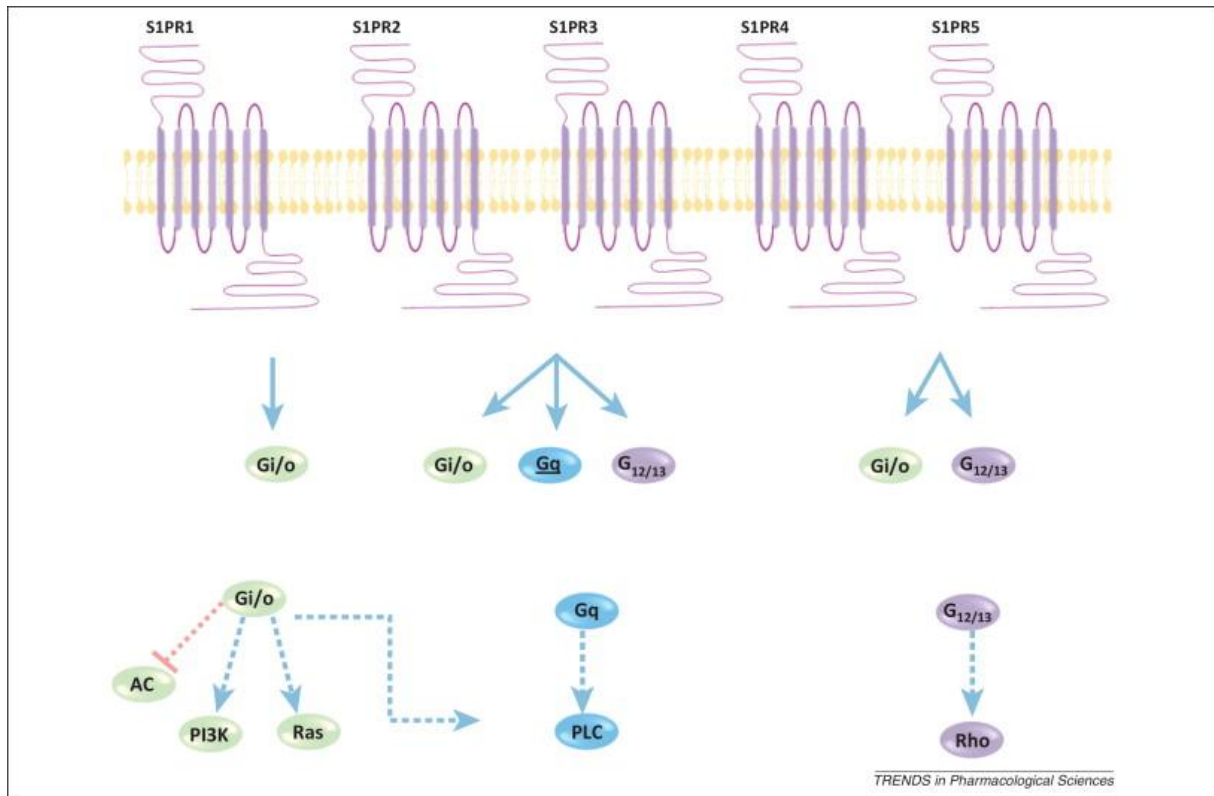


Figure 6

Voies de signalisation des S1PR. Illustration de l'association des S1PR avec leurs protéines G correspondantes et du résultat de l'activation ou de l'inhibition en aval des seconds messagers. Abréviations : AC : adénylate cyclase ; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase ; PLC, phospholipase C. (D'après O'Sullivan et Dev, 2013)

A.3.2.2.1.1 Structure des S1PR

Les S1PR sont formés d'une chaîne protéique typique des récepteurs couplés aux protéines G avec 7 domaines transmembranaires hydrophobes. La partie C-terminale de la chaîne peptidique est située à l'intérieur de la membrane plasmique, tandis que la partie N-terminale est située à l'extérieur de la cellule. Ces récepteurs sont formés d'une chaîne peptidique d'environ 350 à 400 acides aminés. Seule la structure de S1P1 a été cristallisée à l'heure actuelle (Hanson et al., 2012).

La partie N-terminale extérieure va former une poche lipophile qui sera le lieu d'interaction avec la S1P. Après activation, les S1PR sont rapidement internalisés, ce qui peut toutefois permettre une signalisation persistante. La dégradation des S1PR se fait après poly-ubiquitinylation par le protéasome mais il existe des voies de recyclage des récepteurs à la surface (Oo et al., 2011). La privation en S1P semble faciliter l'expression membranaire des S1PR.

A.3.2.2.1.2 Expression et fonctions des S1PR

S1P1, anciennement EDG-1 est le premier récepteur à la S1P qui a été découvert en étudiant des gènes précoces exprimés pendant la différenciation des cellules endothéliales (Lee et al., 1998). Son rôle est fondamental dans l'angiogenèse, les KO complet de *S1pr1* sont létaux chez la souris (Liu et al., 2000). La signalisation de S1P1 a un rôle dans la motilité cellulaire car ce récepteur s'associe préférentiellement avec les sous-unités $G_{\alpha i}$ et $G_{\alpha 0}$ (Okamoto et al., 1998).

S1P2 est un récepteur qui semble inhiber la migration cellulaire, à l'inverse de S1P1 et S1P3 (Lepley et al., 2005). L'activation de S1P2 passe par l'activation des protéines G_{12/13} et G_q, inhibe Rac et a un effet inhibiteur sur la migration cellulaire et l'angiogenèse (Inoki et al., 2006 ; Takashima et al., 2008).

La stimulation des cellules endothéliales par la S1P *via* S1P3 induit la production de NO et protège des dégâts liés à l'ischémie/reperfusion dans des modèles d'infarctus (Nofer et al., 2004 ; Theilmeier et al., 2006). Il a un rôle dans l'entrée de calcium extracellulaire par des canaux voltage-dépendants dans les cellules musculaires *via* un mécanisme faisant intervenir la PLC (Fujii et al., 2014).

S1P4 est principalement exprimé dans les cellules du système hématopoïétique (Graler et al., 1998). Il s'associe uniquement avec les sous-unités α $G_{i/o}$ et $G_{12/13}$ (Graler et al., 2003). Il a sûrement un rôle en association avec S1P1 dans la migration cellulaire (Kohno et al., 2003). S1P4 est fortement exprimé durant le développement des mégacaryocytes et semble avoir un rôle pour la synthèse rapide des plaquettes. L'augmentation du nombre de plaquettes consécutive à une thrombopénie expérimentale est retardée chez les souris déficientes en S1P4 (Golfier et al., 2010).

S1P5 est exprimé dans les oligodendrocytes, il a un rôle dans la survie des oligodendrocytes matures par l'activation de voies de signalisation dépendantes d'AKT (Jaillard et al., 2005), il est aussi impliqué dans la migration des oligodendrocytes immatures (Novgorodov et al., 2007). Il est aussi fortement exprimé par les lymphocytes NK (Walzer et al., 2007).

A.3.2.2.2 Action intracellulaire

Plusieurs arguments expérimentaux suggèrent que la S1P a aussi un rôle de second messenger intracellulaire. Elle est impliquée dans plusieurs processus dont la régulation de l'homéostasie calcique, la croissance cellulaire, la prolifération, l'inhibition de l'apoptose et

les changements du cytosquelette qui ne peuvent pas être seulement expliqués par l'action *via* les S1PR.

Il a été récemment démontré que la S1P, mais pas la dihydro-S1P, pouvait jouer le rôle de cofacteur de l'activité E3 ligase de TRAF2. La signalisation du récepteur au TNF- α fait intervenir TRAF2, une protéine adaptatrice, pour ubiquitinyler RIP-1, un événement critique dans la voie de signalisation dépendante de NF- κ B (Alvarez et al., 2010). Dans la réponse des macrophages stimulés au LPS, il a été montré que la délétion de SphK1 pouvait entraîner une baisse de l'activation de la voie NF- κ B. La PKC delta (PKC δ) est impliquée dans cette régulation en parallèle de l'activité de la SK1 de la voie NF- κ B. *In vitro*, même si la liaison directe de la S1P à la PKC δ n'a pas été démontrée, l'ajout de S1P ou de So (en présence de SK1 recombinante) augmente l'activité de la PKC δ (Puneet et al., 2010). D'autres études ont proposé le ciblage de la SK1 pour réduire l'inflammation (Bachmaier et al., 2012 ; Grin'kina et al., 2012).

Dans le noyau, la présence plus élevée de SK2 n'avait pas de sens jusqu'à ce qu'on découvre que la S1P synthétisée dans le noyau par la SK2 pouvait avoir un rôle dans l'inhibition des Histones désacétylases HDAC1 et 2. Cette activité fait ainsi rentrer la S1P dans la catégorie des molécules de la régulation de l'épigénétique (Hait et al., 2009). Dans la mitochondrie, la S1P produite par SK2 favoriserait l'oligomérisation de Bak, tandis que l'hexadécane, résultant de sa dégradation par la SPL, favoriserait l'oligomérisation de Bax et donc le relargage du cytochrome c (Chipuk et al., 2012). D'un autre côté, la S1P produite par SK2 dans la mitochondrie se lie à la prohibitine 2 (PHB2) et régule l'assemblage du complexe IV indispensable à la respiration mitochondriale (Strub et al., 2011).

Il a été également montré que la S1P pouvait réguler négativement l'activité de CERS2, une enzyme synthétisant des céramides à longues chaînes à partir de la sphingosine. L'augmentation des taux intracellulaires de S1P pourrait ainsi potentialiser ses effets non seulement en diminuant les concentrations de céramide intracellulaire et en augmentant les concentrations de sphingosine, substrat des sphingosine kinases. Un domaine d'homologie avec les S1PR a été découvert dans la structure de CERS2. Cependant la liaison directe de la S1P sur CERS2 n'a pas encore été démontrée et on ne sait pas si la S1P peut se fixer sur d'autres céramide synthases (Laviad et al., 2008).

Il reste possible que la S1P puisse agir sur d'autres voies de signalisation et puisse modifier d'autres événements cytoplasmiques ou nucléaires.

B. Le cancer du sein

B.1 Epidémiologie et intérêt du dépistage précoce du cancer du sein

L'ensemble des cancers mammaires représentent en France plus de 30% de tous les cancers de la femme, c'est encore aujourd'hui le cancer le plus fréquent dans la population de sexe féminin, avec plus de 48000 cas parmi 155004 cas de cancers chez la femme en 2012. C'est un cancer de pronostic plutôt favorable dans l'ensemble, et qui s'améliore, avec un taux de survie à 5 ans de 89%, pour les cancers diagnostiqués entre 2001 et 2004, alors que la survie à 5 ans pour les cancers du sein diagnostiqués entre 1989 et 1991 était de 81% (Binder-Foucard, 2013). Néanmoins, le cancer du sein reste encore la première cause de décès par cancer chez la femme.

Le dépistage est un enjeu majeur dans le cancer du sein, plus la maladie sera dépistée tôt, moins le traitement sera intensif, et plus les chances de réussite seront élevées. En France, le dépistage est gratuit et concerne les femmes de 50 ans à 74 ans. Il est effectué tous les 2 ans et consiste en un examen clinique des seins avec une mammographie en double lecture. Par ailleurs, les gynécologues recommandent l'auto-dépistage et parfois la réalisation de mammographies avant 50 ans en cas de facteurs prédisposants.

B.2 Diagnostic

B.2.1 Imagerie

La mammographie bilatérale est l'examen de référence des lésions du sein. Elle peut être réalisée en cas de signes d'appel cliniques ou dans le cadre d'un dépistage. Elle comprend un minimum de deux incidences par sein. On utilise les critères de l'American College of Radiology (ACR) pour classer en 5 catégories les lésions mammaires observées à la mammographie. En cas d'images ACR 4 ou 5, une biopsie percutanée sera pratiquée.

La mammographie est associée à une échographie mammaire bilatérale comprenant l'examen des aires axillaires. Celle-ci est particulièrement contributive en cas d'image douteuse à la mammographie, ou en cas d'examen mammaire anormal avec une mammographie non informative. Elle peut également être utile pour guider une biopsie.

Une IRM est rarement utile mais peut être discutée dans certaines circonstances, la TEP n'est pas utilisée pour le moment.

B.2.2 L'examen anatomo-pathologique

Il existe plusieurs types de lésions des différents tissus composant le sein. Toutes les masses observées au niveau mammaire ne sont pas des cancers. Seul l'examen anatomopathologique permet de faire la différence entre une affection bénigne ou maligne. Le développement de la biologie moléculaire et les résultats des traitements par les nouvelles chimiothérapies suggèrent que certaines lésions malignes anatomiquement différentes partagent des caractères communs, ce qui a changé la vision que nous avons de ces lésions. Un premier examen anatomopathologique est réalisé par biopsie lors du diagnostic si possible, dans tous les cas, un second examen est réalisé lors de l'exérèse de la tumeur.

B.2.2.1 Types histologiques

La plupart du temps, les lésions mammaires sont des affections bénignes qui seront vérifiées et objectivées par une biopsie et un examen anatomo-pathologique. La classification des lésions mammaires repose principalement sur un examen morphologique et histologique simple. Parmi les lésions bénignes, on trouve les fibroadénomes, la fibrose kystique du sein, les kystes et les adénoses et l'hyperplasie épithéliale mammaire. Les lésions malignes comportent également plusieurs types.

B.2.2.2 Tumeurs malignes

Il existe plusieurs types de cancers du sein qui sont classés différemment en fonction de leurs caractéristiques cellulaires d'origine et de la forme que prend le cancer. La plupart des cancers du sein (95%) sont issus de cellules épithéliales de la glande mammaire, on les appelle des adénocarcinomes. Les autres tumeurs mammaires sont rares et présentent des caractéristiques morphologiques variées qui les différencient. On compte parmi les tumeurs malignes rares, les carcinomes, médullaires, mucineux, tubuleux ou papillaires, les tumeurs phyllodes et les sarcomes.

On distingue différents types histologiques d'adénocarcinome, le type canalaire sans autre spécification (NOS) étant le plus fréquent, suivi par le type lobulaire NOS (Sinn et Kreipe, 2013). Enfin, en fonction de la morphologie des lésions on distingue les carcinomes *in situ* ou infiltrants (Figure 7).

B.2.2.2.1 Les carcinomes *in situ*

Les cellules malignes sont enfermées dans les structures normales, canaux ou lobules, dont la membrane basale persiste et conservent une assise cellulaire myoépithéliale. Deux types sont distingués selon la cytologie et l'emplacement de la prolifération : le carcinome lobulaire *in situ* (CLIS) et le carcinome canalaire *in situ* (CCIS).

B.2.2.2.1.1 Le carcinome lobulaire in situ (CLIS)

Le CLIS ne présente pas de signes cliniques et radiographiques et il est découvert fortuitement par l'anatomopathologiste chez des patients ayant eu une chirurgie pour d'autres raisons comme une mammoplastie, l'excision d'un fibroadénome ou d'un amas de microcalcifications. L'anatomopathologiste découvre le CLIS pendant l'examen au microscope à côté de la lésion bénigne. Un CLIS est rarement associé avec des calcifications. Les calcifications, apparaissent parfois dans la partie nécrotique.

B.2.2.2.1.2 Le carcinome canalaire in situ (CCIS)

Il y a quelques décennies, les CCIS étaient rares et révélés par un écoulement du mamelon ou une tumeur palpable (Contesso et Petit, 1979). Aujourd'hui, ils représentent plus de 10% des cancers du sein et la grande majorité sont découverts en raison de la présence de groupes isolés de microcalcifications sur une mammographie de dépistage. Comme leurs homologues invasifs, les CCIS comprennent de nombreux sous-types histologiques avec des différences de cytologie (petites, grandes cellules, claires, apocrines...) et de structure architecturale (cribliforme, papillaire, massif, micropapillaire, etc). Cependant, les différents sous-types sont souvent retrouvés chez une même patiente.

Le dépistage étendu a conduit à la détection de petits CCIS. Des études en 3-D ont montré que le CCIS est un processus local, s'étendant progressivement vers le mamelon avec un espace limité entre les conduits concernés. Ces études ont conduit au traitement local du CCIS en évitant la mastectomie complète dans un grand nombre de cas (Faverly et al., 1994).

B.2.2.2.2 Les adénocarcinomes infiltrants

En règle générale, trois éléments différents sont associés, le stroma, la composante invasive et éventuellement, une composante *in situ* associée. Le carcinome lobulaire infiltrant le 2^{ème} plus fréquent, il se compose de petites cellules régulières identiques à celles observées dans la forme lobulaire *in situ*. Classiquement les cellules sont dissociées les unes des autres,

ou agencées en fines travées avec des aspects en file indienne ou en cible autour des galactophores non atteints. L'identification de reliquats de carcinome lobulaire *in situ* aide au diagnostic.

Le stroma est essentiel pour la croissance de la tumeur. Il est composé de vaisseaux qui assurent l'apport nutritionnel, de cellules inflammatoires et de tissus hyalins et élastiques. L'étendue et la proportion des éléments constitutifs stromales varient d'un patient à l'autre et dans différentes zones d'une même tumeur. Le tissu fibreux principalement retrouvé dans le centre de la tumeur explique sa dureté et ses capacités rétractiles attirent le tissu entourant la tumeur, ce qui lui donne sa forme en étoile. D'un point de vue histologique, les spicules correspondent à des brins de fibres normales attirés dans la tumeur. Ils peuvent être composés soit d'éléments bénins, soit infiltrés localement ou de manière diffuse par le composant *in situ* ou invasif du carcinome.

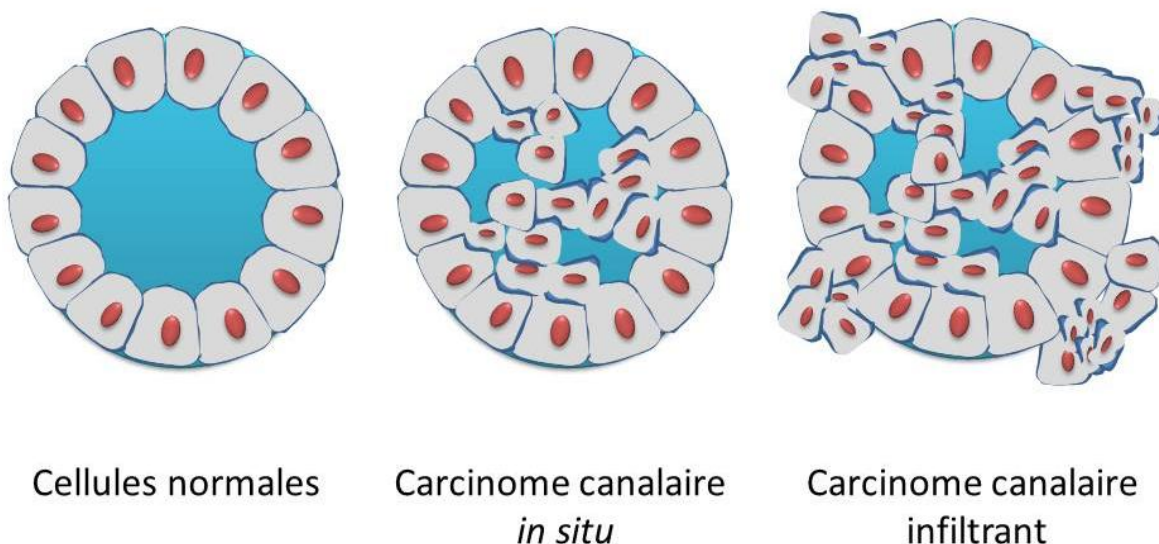


Figure 7
Schéma représentant les différences entre carcinome *in situ* et infiltrant.
 La membrane basale est conservée en cas de carcinome canalaire *in situ* et rompue en cas de carcinome infiltrant.

B.2.3 Classification des cancers du sein

B.2.3.1 Classification moléculaire intrinsèque et anomalies moléculaires

Plus de 80% des cancers du sein sont de type infiltrant. Il existe une grande hétérogénéité en termes de pronostic et de réponse au traitement au sein des différents carcinomes infiltrant. On peut classer au moins en 4 grands groupes différents les tumeurs mammaires en fonction des profils d'expression génique (Perou et al., 2000 ; Sorlie et al.,

2001). Cette classification permet de mieux classer en groupes plus homogènes ces patients. Les cancers luminaux A et B représentent 70 à 80% des cancers, tandis que les cancers de type « HER2-enriched » et « Basal-like » représentent 20 à 30 % des carcinomes infiltrants.

1. Les cancers luminaux de type A (LumA) sont des cancers infiltrants avec une différenciation luminale. Ce type de tumeur porte souvent des mutations activatrices ou une augmentation du nombre de copies, associé à un mauvais pronostic, du gène *PIK3CA*. Des mutations de *GATA3* sont fréquentes, mais c'est la faible expression du facteur de transcription *GATA3* qui est de mauvais pronostic.
2. Les cancers luminaux de type B (LumB) ont un pronostic moins favorable que les luminaux A. Des mutations inactivatrices de *TP53* sont fréquentes dans les cancers de type luminaux B, ils surexpriment parfois le récepteur HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor-2).
3. Les tumeurs surexprimant HER2 avaient un pronostic plus péjoratif que les tumeurs lumineuses A et B avant l'introduction de l'Herceptin® (Trastuzumab), un anticorps ciblant ce récepteur et bloquant la stimulation de ce récepteur. Ces tumeurs portent fréquemment des anomalies de *TP53*.
4. Les tumeurs « basal like » ont le pronostic le moins favorable, surexpriment fréquemment l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR/HER1) et, portent très souvent des mutations de *TP53*.
5. Le groupe de tumeurs initialement classé « Normal breast-like » serait plutôt lié à un artefact de dilution de l'ARNm du tissu cancéreux dans du tissu sain adjacent.

90% des cancers du sein sont sporadiques, il existe cependant des gènes qui entraînent des formes familiales de cancer du sein. L'un de ces gènes en cause, *BRCA1*, dont la protéine est impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN, porte des mutations entraînant une baisse de ses fonctions. Les cancers familiaux associés à des mutations de *BRCA1* sont généralement de type « basal-like ». Il existe aussi d'autres gènes mis en cause dans des formes familiales plus rares de cancer du sein, dont *BRCA2* (Gabai-Kapara et al., 2014).

Les axes de recherches actuels sont focalisés sur l'identification de nouveaux marqueurs pronostiques ou thérapeutiques. L'épigénétique des cancers est aussi en plein essor, ces recherches portent sur la méthylation de l'ADN, les acétylations des histones et les microARNs (miRNAs) (Stecklein et al., 2012).

B.2.3.2 Classification immunohistochimique

L'utilisation de marquage immunohistochimique des récepteurs hormonaux (RH) aux oestrogènes (ER) et à la progestérone (PR) ainsi que d'HER2 est réalisée de façon plus courante. On classe ainsi les tumeurs en 3 groupes RH+, RH-HER2+ et RH-HER2-, autrement appelé cancer triple négatifs (TNBC). La positivité d'un des marqueurs est généralement définie par une expression supérieure ou égale à 10% et ambiguë entre 1 et 9%. Cette classification a surtout un but dans le choix des traitements qui vont être proposés mais des efforts pour adapter la classification moléculaire en classification immunohistochimique ont été réalisés dans ce qui est appelé le consensus de St-Gallen.

Les tumeurs RH+ représentent majoritairement des tumeurs lumineales. Les tumeurs lumineales A expriment fréquemment et fortement le récepteur aux estrogènes (ER) et le récepteur à la progestérone (PR). Les lumineales B ont une expression d'ER plus faible que les types A et ont une différenciation lumineale moins importante. En pratique, c'est la distinction entre les LumA et Lum B qui pose le plus problème. La signature génique qui permet de faire la différence entre les 2 types étant essentiellement basée sur des gènes de prolifération, l'utilisation du marqueur Ki67 comme substitut est recommandé par les experts internationaux. Les LumB ont un index mitotique plus élevés que les Lum A, la limite étant fixée à 20% d'expression de Ki67 mais cette limite reste controversée. Il est aussi possible d'utiliser le grade histologique de la tumeur pour faire la différence entre une tumeur LumA et LumB (Goldhirsch et al., 2011 ; Goldhirsch et al., 2013).

L'analyse de l'expression d'HER2 se fait d'abord sur coupe de tissu, on peut confirmer l'amplification de l'expression d'HER2 par biologie moléculaire (plus de 6 copies d'HER2 pour être diagnostiqué positive). On classe ainsi en 2 groupes les tumeurs HER2 positives : 3+ si la détection immunohistochimique suffit ; 2+ si la confirmation est faite par hybridation *in situ*. Il existe des cas rare d'amplification d'HER2 équivoque ou il n'est pas possible de confirmer ni d'infirmer la surexpression d'HER2. Il existe des cas de tumeurs RH+ HER2+ qui sont plutôt classé parmi les tumeurs Lum B (Wolff et al., 2018).

Les tumeurs dites triple négatives (TNBC) sont négatives pour les 3 récepteurs ER, PR et HER2. Les cancers du sein de type TNBC et « basal-like » pourrait être identifiés par l'expression de l'EGFR et des cytokératines CK5/6. Les autres types de TNBC seraient ainsi appelé quintuple négatifs (Cheang et al., 2008).

B.2.3.3 Classification moléculaire des TNBC et récepteur aux androgènes

Les TNBC sont majoritairement des tumeurs de types « basal-like » même s'il a été suggéré qu'il pouvait y avoir d'autres types de signatures moléculaires (Bas Kreike, breast cancer res 2007). Des travaux récents ont permis de séparer les TNBC en plusieurs groupes de tumeurs distinctes ; les tumeurs mesenchymateuses (ML) et mesenchymateuses-souches (MSL), basales 1 et 2 (BL1 et BL2), immunomodulatrices (IM) et luminales récepteurs aux androgènes (LAR) (Lehmann et al., 2011). Une autre proposition a été faite en classant les TNBC en 4 groupes ; mesenchymateuses (MES), Luminales AR (LAR), basales immunoactivés (BLIA) et basales immunosuppressives (BLIS) (Burstein et al., 2015). Enfin, une dernière étude a classé les TNBC en 3 groupes LAR, BL avec faible réponse immunitaire, BL avec forte réponse immunitaire (Jezequel et al., 2015). Les 2 dernières classifications des TNBC ont un impact pronostic. L'utilisation du récepteur aux androgènes en IHC comme marqueur pour identifier les LAR est intéressante dans ce contexte où il existe dans anti-androgènes utilisable en clinique. Les tumeurs avec activation du système immunitaire semblent être celles qui ont le meilleur pronostic.

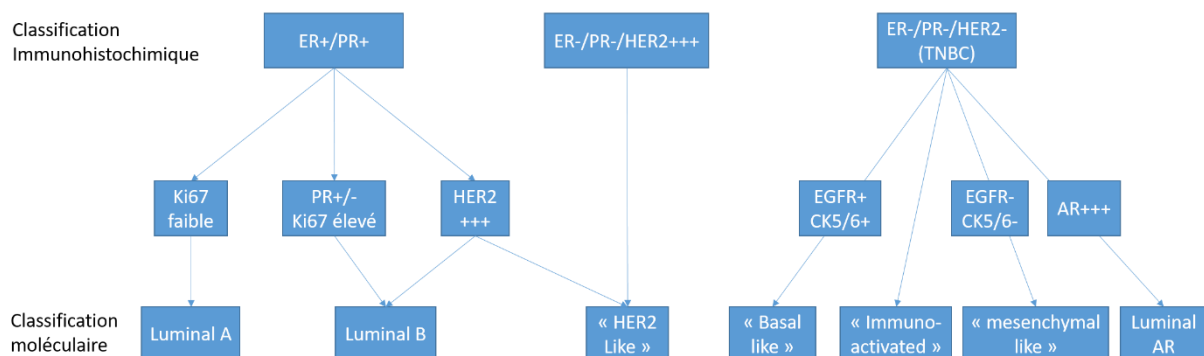


Figure 8
Classification des adénocarcinomes infiltrant. Classification simplifiée immunohistochimique et moléculaire des adénocarcinomes infiltrant

B.2.4 Bilan d'extension et classification TNM

L'examen Clinique et le bilan d'extension par l'imagerie et l'anatomopathologie vont servir à classer la tumeur selon la classification TNM de l'IUCC (International Union of Cancer Control). T pour tumeur primaire, N pour Node (métastase ganglionnaire), et M pour les Métastases (cf. Annexe 1). On utilise une classification avant l'intervention et on reclasse après chirurgie. On distingue ainsi 4 classes de cancer et 3 sous classes (HAS, 2010). Cette classification TNM a un caractère pronostique bien établi (Uehiro et al., 2013). Elle vient d'être actualisé pour la 8^{ème} édition, mais avec peu de changements par rapport à la version précédente (Giuliano et al., 2017).

B.3 Prise en charge

La prise en charge du cancer du sein est effectuée en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP). Elle fait intervenir les chirurgiens, les radiologues, les oncologues et les pathologistes. L'organisation du traitement repose sur la chirurgie en premier lieu, et selon les cas, la radiothérapie et/ou la chimiothérapie (Curigliano et al., 2017).

B.3.1 Chirurgie

La chirurgie est le premier geste thérapeutique dans la prise en charge du cancer du sein. En fonction du type de tumeur et du choix de la patiente, il pourra être choisi une mastectomie partielle ou totale. Dans le cas d'une mastectomie partielle, il peut rester un risque de ne pas enlever la totalité des cellules tumorales et de laisser un site à risque de rechute. En cas de carcinome infiltrant, le (ou les) premier(s) ganglion(s) sentinelles recevant le drainage lymphatique axillaire du sein sont enlevés et analysés. Un curage axillaire sera réalisé en cas d'envahissement du ganglion sentinelle ou d'adénopathies préalables. En cas de carcinome in situ, on ne pratique pas de curage axillaire d'emblée et l'analyse du ganglion sentinelle n'est pas systématique.

B.3.2 Radiothérapie

La radiothérapie sera proposée en cas de mastectomie partielle pour un carcinome *in situ* ou en cas de carcinome infiltrant. La zone traitée sera fonction de la taille de la tumeur, du type de tumeur et de l'envahissement ganglionnaire. Elle pourra être faite d'emblée ou après une chimiothérapie adjuvante.

B.3.3 Chimiothérapie

La prescription d'une chimiothérapie adjuvante sera indiquée en cas de carcinome infiltrant avant la radiothérapie. Son choix sera fonction des facteurs pronostiques et de réponse au traitement. Classiquement, elle sera basée sur le 5-Fluorouracile (5-FU), l'Epirubicine et le Cyclophosphamide et le Docétaxel.

La chimiothérapie débutera classiquement 3 à 6 semaines après l'intervention chirurgicale. Les protocoles comprennent habituellement entre 4 et 6 cures espacées de 21 jours. Le suivi sera effectué en fonction du type de chimiothérapie prescrite.

B.3.4 Hormonothérapie

L'hormonothérapie sera choisie en fonction de l'âge de la patiente, de son statut ménopausique et de l'expression des récepteurs hormonaux. Classiquement, on proposera la Tamoxifène chez les femmes ménopausées ou non et, en séquentiel, des inhibiteurs de l'aromatase chez les femmes ménopausées. La durée du traitement hormonal est généralement de 5 ans, des résistances aux traitements hormonaux peuvent être une source de récurrence ou de métastases en particulier après l'arrêt du traitement (Pan et al., 2017). Les traitements basés sur l'utilisation d'anti-androgènes ont également été testés chez les patientes ayant une tumeur AR+ mais avec des effets thérapeutiques limités (Bonnefoi et al., 2016 ; O'Shaughnessy et al., 2016 ; Schwartzberg et al., 2017).

B.3.5 Médecine personnalisée et nouvelles chimiothérapies

Le développement des anticorps monoclonaux (AcM) et l'identification de cibles thérapeutiques a profondément changé le pronostic et le devenir des patientes atteintes de cancers du sein. L'Herceptin® est un AcM bloquant la dimérisation d'HER2 qui empêche l'initiation d'un signal prolifératif. Il est utilisé dans les tumeurs mammaires HER2+ (3+ ou 2+) et a changé le pronostic de ce type de cancer, mais il est aussi utilisé dans d'autres types de cancer surexprimant HER2. Une autre molécule inhibant les tyrosines kinases d'HER2 et d'EGFR, le Tykerb® (Lapatinib) est également utilisable (Escriva-de-Romani et al., 2018). Les inhibiteurs de poly ADP ribosyl polymérase (PARP) ont été utilisés dans les cancers du sein triples négatifs et semble plus efficace en cas d'anomalies dans la réparation des dommages à l'ADN de type *BRCA1* (Severson et al., 2017).

B.3.6 Immunothérapies

Le développement récent des immunothérapies essentiellement dans le mélanome et le cancer du poumon des inhibiteurs de checkpoint immunitaires anti-CTLA4 et anti-PD1 ou anti-PDL1 a relancé l'intérêt de la réponse immunitaire dans les cancers. Des essais d'immunothérapies avec ont été réalisés sur des tumeurs mammaires mais avec un succès modéré. Il semble à première vue que ce soit les TNBC qui répondent le mieux aux immunothérapies mais il n'existe pas de marqueur actuel pour sélectionner les patientes qui peuvent potentiellement bénéficier (Pusztai et al., 2016). Cette partie sera développée avec la réponse immunitaire dans les cancers du sein (*cf.* paragraphe C.2.5)

B.4 Sphingolipides et cancer du sein

Le rhéostat sphingolipidique entre la S1P (pro-tumorale) et le céramide (pro-apoptotique) joue un rôle clé dans l'initiation tumorale, la survie, la prolifération ou la réponse aux thérapies. La dérégulation et les modifications du métabolisme des sphingolipides ont été impliquées dans plusieurs cancers. Les modifications touchant les enzymes synthétisant ou dégradant les sphingolipides peuvent impacter plusieurs fonctions cellulaires et en font des cibles thérapeutiques potentielles (Newton et al., 2015) (Figure 9).

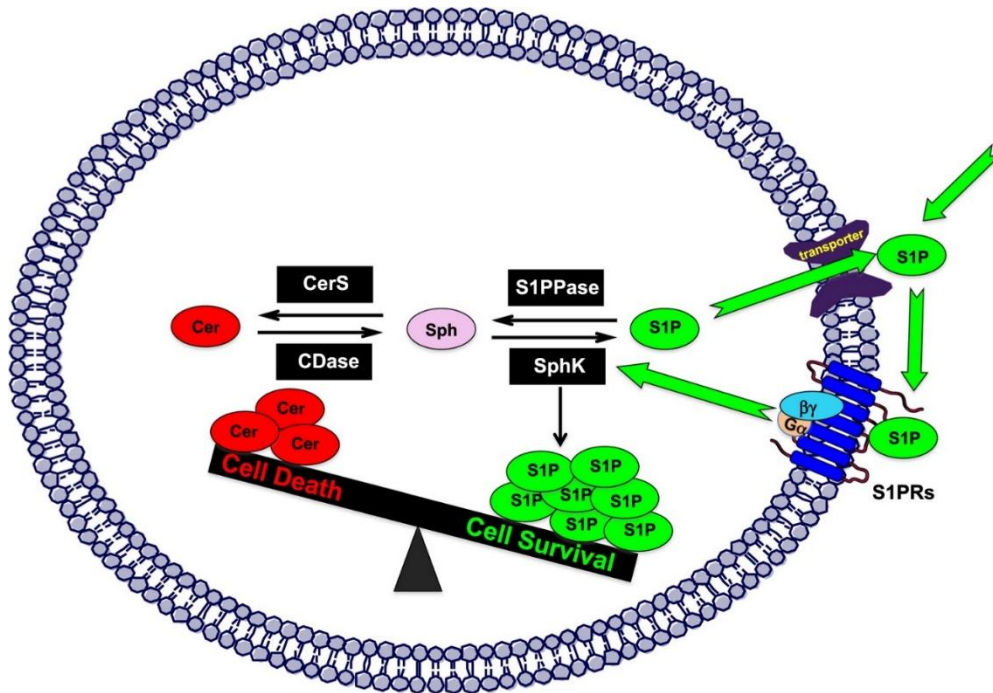


Figure 9

Concept du rhéostat sphingolipidique. Le céramide d'un côté est associé à la mort cellulaire. La S1P agissant sur ses récepteurs promeut la survie cellulaire. Dans les cancers, cet équilibre est déplacé par les enzymes du métabolisme des sphingolipides vers la S1P. CerS, céramide synthase ; CDase, céramidase ; S1PPase, S1P phosphatase ; SphK, Sphingosine kinase ; S1PRs, récepteurs à la S1P (D'après Newton et al., 2015)

B.4.1 Dosage de sphingolipides dans les cancers

Le développement de la spectrométrie de masse a permis l'essor de la lipidomique et le dosage de différents lipides présents dans des échantillons biologiques. Cependant, des facteurs comme l'âge, le sexe et l'IMC peuvent influencer ces dosages (Weir et al., 2013). L'interprétation des taux de sphingolipides circulants comme le reflet de l'activité tumorale est à faire avec précaution. Dans le cancer du sein, les taux de sphingolipides mesurés dans les tumeurs sont généralement plus élevés pour toutes les espèces par rapport à du tissu sain non cancéreux (Nagahashi et al., 2016 ; Moro et al., 2018). Une étude a mis en évidence qu'un taux élevé de sphingomyéline était associé à un meilleur pronostic dans les tumeurs TNBC (Purwaha et al., 2018).

B.4.2 Expression de SPL et SGPP

La SPL est la seule enzyme capable de dégrader la S1P de façon irréversible. Dans des lignées de cancers du sein, l'expression de la SPL est nettement diminuée par rapport à des lignées de cellules épithéliales mammaires non cancéreuses (Engel et al., 2018). Cependant, une étude sur la SPL dans le cancer du sein a montré que l'expression de *SGPL1* était augmentée dans du tissu cancéreux par rapport à du tissu sain non adjacent, mais ne retrouvait pas d'impact pronostic du niveau d'expression de *SGPL1* (Moro et al., 2018). Une autre étude associait l'expression de *SGPL1* à un pronostic défavorable (Lei et al., 2018). Deux enzymes peuvent déphosphoryler la S1P en sphingosine la SGPP1 et la SGPP2. Il a été retrouvé dans une étude qu'un fort niveau de SGPP2 était associé à une meilleure survie sans rechute dans le cancer du sein (Purwaha et al., 2018). Il semble dans tous les cas que les cellules cancéreuses du sein aient un bénéfice à ne pas dégrader la S1P.

B.4.3 Expression des sphingosine-kinases et S1P

Plusieurs études ont montré qu'une augmentation de l'expression d'ARNm codant pour *SPHK1* était associée à un mauvais pronostic dans les cancers du sein ER- et dans les cancers de haut grade (Ruckhaberle et al., 2008 ; Datta et al., 2014). La forte expression protéique en IHC de SK1 a été confirmée comme étant de mauvais pronostic en analyse multivariée (Zhu et al., 2017) et toujours associée au sous-type triple négatif (Do et al., 2017). Une étude ne retrouvait pas d'impact pronostic négatif de l'expression de *SPHK1* mais un impact pronostic positif d'une forte expression de *SPHK2* y compris dans les TNBC (Lei et al., 2018). La signalisation *via* la SK1 est associée à une augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 et d'AKT (Datta et al., 2014). La SK1 est capable de se localiser sous la membrane plasmique après phosphorylation par ERK1/2 (Pitson et al., 2003) et en réponse à une activation de la PKC (Johnson et al., 2002). La localisation de SK1 n'empêche pas une relocalisation potentielle de la S1P dans d'autres zones intracellulaires (Siow et al., 2010). Toutefois, la localisation de la SK1 à la membrane plasmique pourrait faciliter l'export de la S1P par ses transporteurs. Même si l'homéostasie des sphingolipides intracellulaires, un élément clé dans les processus tumoraux, ne semble pas dépendante des S1PR, la majorité des effets de la S1P produite par les cellules tumorales passe par la stimulation des S1PR (Figure 10). L'activation des S1PR joue un rôle en modulant d'autres voies de signalisation en réponse aux hormones et aux cytokines. Ces effets sont différents en fonction des sous types de cancers du sein et des modèles cellulaires.

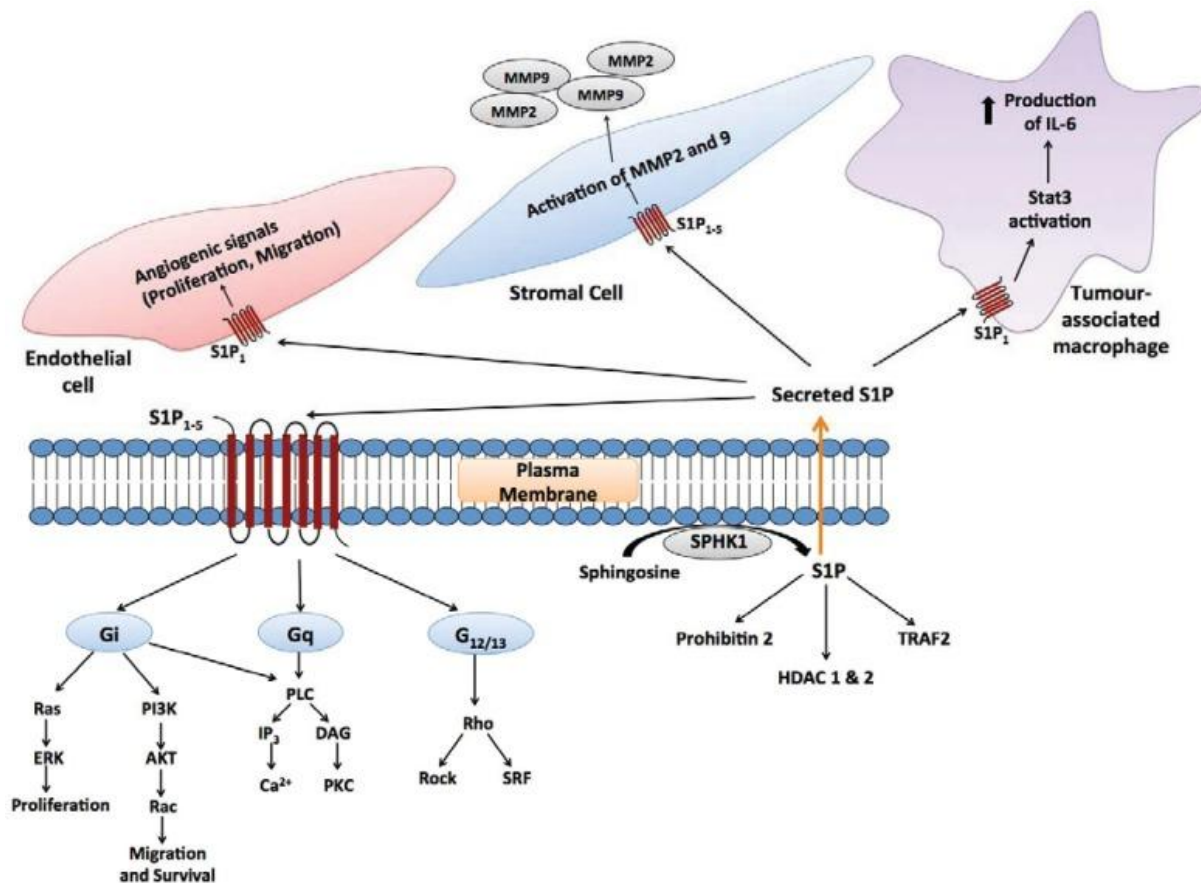


Figure 10
Signalisations autocrine et paracrine de la S1P.

La S1P secrétée par les cellules tumorales est capable d'induire une signalisation autocrine et paracrine en agissant sur les cellules du microenvironnement. Dans le contexte de la biologie tumorale, cela inclut les cellules endothéliales, les cellules stromales, les macrophages associés aux tumeurs, et les cellules de l'immunité adaptative. DAG: Diacylglycerol; ERK: extracellular regulated kinase; HDAC 1 & 2: Histone desacetylase 1 and 2; IL-6: Interleukin-6; IP3: Inositol triphosphate; MMP2 and 9: Matrix metalloproteinase 2 and 9; PI3K: phosphatidylinositol 3' kinase; PKC: Protein kinase C; Rock: Rho-associated protein kinase; S1P1-5: S1P receptors 1 to 5; SPHK1: Sphingosine kinase 1; SRF: Serum response factor; TRAF2: TNF receptor associated factor 2. (D'après Don et al., 2014)

B.4.3.1 S1P et signalisation du récepteur aux œstrogènes

Dans les cancers du sein ER+, la stimulation par l'œstradiol (E2) induit l'activation de SK1 et la production de S1P (Sukocheva et al., 2003). La S1P produite active principalement le récepteur S1P3. La stimulation de S1P3 est capable d'une part de stimuler la phosphorylation de ERK1/2 ce qui augmente l'effet de la transduction du signal E2-dépendant. S1P3 est aussi impliqué dans la transactivation de l'EGFR. En effet, E2 entraîne une phosphorylation d'EGFR et le blocage de la SK1 ou de S1P3 prévient cette phosphorylation (Sukocheva et al., 2006). La même équipe a montré que cette transactivation d'EGFR par la S1P *via* S1P3 nécessitait l'activation de la GTPase Cdc42 (Sukocheva et al., 2013).

Il a été montré que les patientes avec une forte expression cytoplasmique de S1P1 ou S1P3 avaient un moins bon pronostic que les autres (Watson et al., 2010). Comme les récepteurs à la S1P sont internalisés après stimulation, cela renforce l'hypothèse de l'activation de S1P3 comme promoteur de la progression tumorale. Au final, la localisation membranaire, cytoplasmique ou nucléaire des S1P1, S1P2 ou S1P3 est importante, mais l'association avec les protéines de signalisation activée en aval est aussi importante pour le pronostic et complexifie les subdivisions en classes de bons ou mauvais pronostics des patientes (Ohotski et al., 2012). L'utilisation d'un Ac bloquant S1P3 ralentit la croissance tumorale de cellules MCF-7 (Michigan Cancer Foundation 7) dans un modèle de xéno greffe (Harris et al., 2012). Le ciblage de l'action de la S1P ou de S1P3 en complément des thérapies anti-EGFR pourrait être proposé dans ce contexte.

Cependant, même si de nombreux essais de phase I ciblant la SK1 sont en cours, il a été montré que l'activité sphingosine kinase des cellules tumorales n'était pas nécessaire à leur viabilité (Rex et al., 2013).

B.4.3.2 S1P et signalisation indépendante du récepteur aux œstrogènes

Dans le cas de cellules MCF-7 transfectée avec HER2, il a été montré que l'activité SK1 était augmentée par la présence du récepteur HER2. Cette augmentation de l'activité SK1 semble bénéfique car elle a pour but de réprimer l'expression d'HER2 et la S1P ne semble plus activer la migration cellulaire induite par S1P3 (Long et al., 2010). L'expression du récepteur S1P3 est aussi augmentée dans la lignée MDA-MB-231 par la prostaglandine PGE2 et favorise la migration cellulaire en réponse la S1P (Filipenko et al., 2016).

Dans des cellules ER-/HER2+, la S1P va agir sur le récepteur S1P4 et entraîner une activation des kinases ERK1/2 *via* un mécanisme dépendant d'HER2 (Long et al., 2010). Il a été identifié que le récepteur S1P4 cytoplasmique exprimé fortement était un facteur de mauvais pronostic, avec un nombre de rechute plus important et un envahissement ganglionnaire plus fréquent dans des cancers ER- (Ohotski et al., 2012).

Dans les cancers de type TNBC, l'insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP3) en agissant sur le récepteur IGF1R permet l'activation de SK1 et une augmentation de son expression et une synthèse d'ADN dans les lignées cellulaires (Martin et al., 2009). Les cellules de type TNBC produisent de l'IGFBP3, tandis que les cellules MCF-7 et T47-D (lignées ER⁺) ne synthétisent pas d'IGFBP3. L'IGFBP3 augmente la sensibilité des cellules de type TNBC à une stimulation *via* l'EGFR par un mécanisme faisant intervenir la SK1. La

baisse d'activité de la SphK1 potentialise l'effet du blocage de la stimulation dépendante d'EGFR. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de la SK1 et 2, associée à un inhibiteur de la signalisation d'EGFR potentialise l'inhibition de la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*. Cette association pourrait être utile en cas de résistance aux thérapies ciblant l'EGFR (Martin et al., 2014).

Les études dans les cancers du sein ER- ou dans la signalisation indépendante des récepteurs hormonaux bien que plus restreintes mais semblent quand même en faveur d'un rôle pro tumoral de la S1P.

B.4.3.3 Action dépendante de SK2

La localisation de cette enzyme se fait au niveau des organelles et du noyau de la cellule. Son rôle pro ou anti-apoptotique est plus controversé que la SK1 et semble dépendre de la localisation de la SK2 et de son niveau d'expression (Neubauer et al., 2016).

SK2 a été impliquée dans la migration en réponse à l'EGF dans une lignée de cancer du sein ER- (Hait et al., 2005). Plus récemment, il a été mis en évidence par le groupe de Sarah Spiegel que l'inhibition de la SK2 par le FTY720 empêchait la production de S1P au niveau nucléaire et permettrait une réexpression du récepteur aux œstrogènes par un mécanisme dépendant des HDAC (Hait et al., 2015).

B.4.3.4 Rôle sur les cellules souches cancéreuses

Il existe certaines cellules cancéreuses qui peuvent avoir des propriétés de cellules souches et qui contribuent aux métastases à distance et aux rechutes. Ces cellules initiatrices de cancers ont des propriétés immunologiques et métaboliques différentes des cellules cancéreuses plus différenciées (Magee et al., 2012). Dans le cancer du sein, il existe certaines cellules souches cancéreuses (CSC) et l'expansion de cellules ALDH+ est stimulée par l'action de la S1P sur le récepteur S1P3 indépendamment de l'activation par des ligands de NOTCH (Hirata et al., 2014). De façon intéressante, il a été également montré que des phtalates sont capables d'induire l'activation de SK1 et de S1P3 pour favoriser l'apparition d'une « Side-population » dans des lignées de cancers du sein ER+ et ER- (Wang et al., 2016).

B.4.3.5 Rôle dans la néoangiogénèse et les métastases

Le récepteur S1P1 est important dans l'angiogénèse normale et tumorale (Chae et al., 2004 ; LaMontagne et al., 2006). Le FTY720 diminue l'angiogénèse tumorale (Schmid et al., 2007). S1P1 serait aussi impliqué dans la lymphangiogénèse *in vitro* (Yoon et al., 2008). Cette hypothèse a été testée *in vivo* dans la cadre de la lymphangiogénèse pour expliquer l'envahissement ganglionnaire dans le cancer du sein. Diminuer la néoangiogénèse a aussi pour effet de diminuer le recrutement de macrophages qui promeuvent la néoangiogénèse et la lymphangiogénèse (Nagahashi et al., 2012). Les macrophages recrutés dans la tumeur peuvent être stimulés par la S1P *via* S1P1, ce qui induit l'activation du facteur de transcription NF- κ B, qui va activer la production d'IL-6. L'IL-6 ainsi produite va activer le facteur de transcription STAT-3, *via* le récepteur à l'IL-6, qui est lui-même un activateur de la transcription de S1P1, créant ainsi une boucle d'auto-amplification (Lee et al., 2010). L'action de la S1P sur les macrophages *via* S1P1 serait aussi capable de stimuler la production de lipocaline, ce qui favoriserait la lymphangiogénèse (Jung et al., 2016). Une autre étude récente a mis en cause l'inflamasome et la production d'IL1- β par les macrophages en réponse à la stimulation de S1P1 dans la lymphangiogénèse (Weichand et al., 2017).

D'autres études sont en faveur du rôle de la SK1 et de S1P1 dans l'établissement de métastases par l'induction de metallo-protéase de la matrice (MMP) (Ponnusamy et al., 2012 ; Ko et al., 2016 ; Zhang et al., 2017). La S1P pourrait aussi agir sur S1P3 et stimuler l'expression de MMP9 sur les cellules tumorales (Kim et al., 2011). En contrepartie, le récepteur S1P2 a été montré comme ayant des effets anti-tumoraux sur les cellules endothéliales et les cellules myéloïdes infiltrant les tumeurs, il empêche l'angiogénèse par une diminution de l'expression de VEGF et de MMP9 (Du et al., 2010).

B.4.3.6 Résistances aux chimiothérapies et radiothérapies

La SK1 mais pas la SK2 a été impliquée dans la résistance au tamoxifène, la diminution de l'expression de *SPHK1* permettant de rétablir la sensibilité au tamoxifène dans des lignées MCF-7 résistantes (Sukocheva et al., 2009). La SK2 a par contre été impliquée dans la résistance à l'induction d'apoptose par la doxorubicine dans des MCF-7 (Sankala et al., 2007). En utilisant un inhibiteur de SK2, la résistance aux chimiothérapies a été diminuée dans des lignées MCF-7 (Antoon et al., 2011). Une autre étude avait montré que l'inhibition pharmacologique des 2 sphingosine kinases pouvait sensibiliser à l'apoptose induit par

l'étoposide ou la doxorubicine des cellules MCF-7 résistantes à l'apoptose induite par le TNF. Ce mécanisme passerait par l'augmentation du taux de sphingosine (Antoon et al., 2012).

Dans des modèles cellulaires de type TNBC, il a été montré que l'utilisation de siRNA ciblant la SK1, sensibilisait fortement les cellules à l'action du 5-FU ou de la doxorubicine (Datta et al., 2014). Il a été aussi proposé d'utiliser le FTY720, pour augmenter la sensibilité des lignées de cellules de TNBC (MDA-MB-361) à la radiothérapie, le mécanisme d'action passerait par une inhibition de la SK1 (Marvaso et al., 2014). Le FTY720 a aussi été utilisé pour sensibiliser des lignées cellulaires à l'induction de l'apoptose par des ligands de TRAIL (Woo et al., 2015). Des nanoparticules contenant du FTY720 en combinaison avec du docétaxel ont montré une potentialisation de l'induction d'apoptose en réponse au docétaxel (Alshaker et al., 2017).

Toutes ces études impliquent les sphingosine kinases, et en particulier la SK1, dans la résistance aux chimiothérapies et à la radiothérapie.

B.4.4 Céramide

Le métabolisme du céramide a été impliqué tôt dans la mort cellulaire induite par les chimiothérapies (Lucci et al., 1999). Des modifications de son métabolisme par des inhibiteurs pharmacologiques ou des approches génétiques ont permis de clarifier son rôle pro-apoptotique dans le cancer du sein. Par exemple, la downrégulation de SK1 par un siRNA a pour conséquence d'entraîner l'accumulation de céramide, et plus particulièrement de céramide C16:0, dans des cellules de cancers du sein et favoriser l'apoptose (Taha et al., 2006). Le céramide va pouvoir être actif directement en tant que médiateur pro-apoptotique, mais des analogues de céramides vont aussi pouvoir être utilisés.

B.4.4.1 Sphingomyélinases

Le TNF- α est un inducteur de l'activité de la nSMase2 et entraîne une augmentation du taux de céramide dans des cellules MCF-7 (Clarke et al., 2011). La daunorubicine est également capable d'induire une augmentation de l'activité sphingomyélinase neutre et de l'expression d'ARNm codant pour la nSMase2 dans des MCF-7 (Ito et al., 2009). Il a également été montré que le Sunitinib inhibait la sphingomyélinase acide et perturbait la perméabilité lysosmale. Ce mécanisme entraîne la mort cellulaire et permet de restaurer la sensibilité de cellules tumorales résistantes à plusieurs chimiothérapies dont le docétaxel (Ellegaard et al., 2013).

B.4.4.2 Céramide synthases

De façon curieuse, l'expression de plusieurs céramide synthases (*CERS2*, *CERS4* et *CERS6*) est plus élevée dans des tissus cancéreux que dans des tissus sains (Erez-Roman et al., 2010). Les taux de céramides C16:0, C24:0 et C24:1 ont aussi été observés plus élevés dans des tumeurs que du tissu sain (Schiffmann et al., 2009). En parallèle, il a été montré que les céramide synthases n'avaient pas le même niveau d'expression en fonction du type de cancer. Par exemple, le niveau d'expression de *CERS4* et *CERS6* est plus élevé dans les cancers de type ER+ (Ruckhaberle et al., 2008). Il existe une activation de la transcription de *CERS4* et de *CERS5* par le 17 β -estradiol qui se fixe sur son récepteur (Wegner et al., 2014). Dans des modèles cellulaires, la surexpression de *CERS4* ou *CERS6* est associée à une inhibition de la prolifération cellulaire (Hartmann et al., 2012). La diminution de l'expression de *CERS6* est associée au processus d'EMT et diminue le taux de céramide C16:0 dans les cellules pour faciliter leur migration en réponse à CD95L (Edmond et al., 2015). Il a aussi été mis en évidence récemment que le C16-Cer avait un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire de cellules MCF-7 en diminuant la phosphorylation de mTOR (Kim et al., 2018).

B.4.4.3 Céramidases

C'est surtout la céramidase acide codée par *ASAH1* qui a été étudiée dans le cancer du sein. Il y a une expression d'*ASAH1* plus élevée dans les cancers du sein ER+ et une forte expression d'*ASAH1* est associée à une meilleure survie sans événement dans les cancers ER+ et en analyse multivariée tous cancers confondus (Ruckhaberle et al., 2009). Dans une étude ultérieure de la même équipe, les mêmes résultats ont été obtenus mais en remarquant que c'était dans les cancers luminaux B que la forte expression d'*ASAH1* avait un impact pronostic positif. La forte expression d'*ASAH1* en IHC et en expression protéique était retrouvée aussi pour les carcinomes in situ (Sanger et al., 2015). Une autre étude montrait qu'une plus forte expression d'*ASAH1* était associée à un meilleur pronostic dans des TNBC (Purwaha et al., 2018). D'autres auteurs ne retrouvaient pas de différences de l'expression d'*ASAH1* en IHC entre 2 groupes de patients répondeurs et non répondeurs à la chimiothérapie néoadjuvante (Li et al., 2018). L'utilisation du Céranib, un inhibiteur de la céramidase acide induit l'apoptose de lignées MCF-7 et MDA-MB-231 (Vethakanraj et al., 2015). La combinaison entre un inhibiteur de la céramidase acide combiné à un apport de C6-céramide exogène entraîne aussi une potentialisation de la mort cellulaire (Flowers et al., 2012). Enfin, *ASAH1* est aussi impliqué dans la régulation de la production de cytokines par les cellules cancéreuses dont le TNF- α , l'IL-6, CCL5 et CCL2 (Newcomb et al., 2018).

B.4.4.4 Céramide kinase

L'expression du gène *CERK* est associée à l'expression d'HER2 et à la négativité d'ER, ce qui suggère son association avec le sous type de cancer du sein HER2+++ . Une forte expression du gène *CERK* est associée à une moins bonne survie sans  v nement dans les cancers ER- mais pas dans les ER+ (Ruckhaberle et al., 2009). Une méta-analyse a montré un impact sur la survie sans rechute de l'expression. Dans cette même étude, les auteurs ont montré que la céramide kinase pouvait être un moyen d'échappement des cellules tumorales à l'apoptose après une diminution de la signalisation du récepteur HER2 dans des modèles murins (Payne et al., 2014). La CERK est aussi impliquée dans la production de CCL5 en réponse au TNF-à dans des cellules MCF-7 (Newcomb et al., 2018).

B.4.4.5 Chimiothérapies, céramide et analogues de céramides

L'utilisation de taxol permet d'induire une accumulation de céramide et entraine l'apoptose de cellules tumorales avec des sensibilités variant en fonction des types de cellules (Charles et al., 2001). De même, l'utilisation de céramide exogène augmente la mort par apoptose de cellules trait es par du docétaxel (Feng et al., 2014) en inhibant l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR et de la voie des MAPK (Yang et al., 2015). De façon similaire, le tamoxifène va pouvoir avoir un effet synergique avec d'autres drogues induisant l'apoptose par la voie intrinsèque. Cet effet passe par un mécanisme dépendant de l'accumulation de céramide (Roberts et al., 2007).

L'utilisation de C2-céramide exogène a aussi été montrée comme augmentant l'apoptose et l'effet du traitement par la doxorubicine *in vitro* et *in vivo* (Che et al., 2017). L'inhibition de voies de métabolisation ou de dégradation du céramide en combinaison avec du C6-céramide exogène potentialise les cassures à l'ADN dans des cellules de cancer du sein par un mécanisme impliquant la production de ROS (Chan et al., 2007). Ces céramides synthétiques à chaines courtes peuvent être hydrolys es puis participer à la formation de céramides naturels par l'action des CERS (Ogretmen et al., 2002), ou être m etabolis es en C6-SM ou en C6-GlcCer dans les cellules (Chapman et al., 2010).

Des analogues de céramides ont été synth etis es et utilisés pour induire de l'apoptose dans des cellules cancéreuses (Struckhoff et al., 2004) certains analogues vont entrainer une accumulation de sphinganine dans les cellules cancéreuses alors que du C8-céramide pourra être transform e en S1P (Antoon et al., 2009). Ils vont pouvoir être utilisés y compris sur des cellules résistantes (Ponnapakam et al., 2014).

La production de liposomes a été testée pour augmenter la libération de C6-céramide dans des cellules cancéreuses *in vitro* (Stover et Kester, 2003) en limitant également la croissance tumorale *in vivo* (Stover et al., 2005). La combinaison de liposomes avec des chimiothérapies semble prometteuse car elle permettrait d'augmenter la libération de ces chimiothérapies de façon plus spécifiques tout en diminuant potentiellement les effets secondaires (Tran et al., 2008 ; Morad et al., 2012). Des optimisations de la formulation des liposomes pourraient permettre d'améliorer encore leur efficacité (Overbye et al., 2017).

B.4.5 Glucosylcéramides et gangliosides

La synthèse de glucosylcéramide permettrait d'éviter l'apoptose induite par de fortes concentrations de céramide. Les glucosylcéramides et les gangliosides sont aussi impliqués dans d'autres processus que l'apoptose. Il existe une baisse d'expression d'*UGCG*, l'ARNm codant pour la GCS, dans les cancers du sein ER- par rapport aux cancers ER+ (Ruckhaberle et al., 2009). Une étude en IHC a aussi permis de mettre en évidence que l'expression de la GCS était associée au cancer du sein de type Luminal A (Liu et al., 2014). Le groupe de Myles Cabot a montré que le tamoxifène ralentissait la production de GlcCer dans des cellules MCF-7 (Cabot et al., 1996) et que dans des MCF-7 résistantes à la doxorubicine, on pouvait observer une accumulation de GlcCer (Liu et al., 1999). De manière analogue, l'expression forcée de la GCS dans des MCF-7 rend ces cellules résistantes à la doxorubicine (Liu, cabot JBC 1999). Et l'inhibition de l'expression de l'ARNm codant pour la GCS dans des MCF-7 résistantes restaure leur sensibilité à la doxorubicine (Liu et al., 2000). L'inhibition enzymatique de la GCS réduit l'expression de la P-glycoprotéine (PGP) codée par le gène *MDR1*, une protéine de transport non spécifique impliquée dans la chimiorésistance (Gouaze et al., 2005). Dans une étude sur des tumeurs mammaires, il a été noté que la chimiothérapie induisait une augmentation de l'expression d'*UGCG* et une baisse relative du céramide C16:0 (Che et al., 2017).

De manière opposée par rapport à *UGCG*, *UGT8*, le gène codant pour l'enzyme synthétisant du galactosylcéramide, est plus exprimée dans les cancers du sein ER- et à fortiori de type « basal-like » ou TNBC (Culhane et Quackenbush, 2009 ; Ruckhaberle et al., 2009 ; Santuario-Facio et al., 2017). Une forte expression d'*UGT8* serait associée avec une augmentation des métastases pulmonaires, mais cette étude n'a pas pu analyser l'impact de l'expression d'*UGT8* dans les différents sous types de cancers (Dziegiel et al., 2010). Il avait pourtant été montré précédemment qu'une forte expression d'*UGT8* était associée à un

mauvais pronostic dans les cancers ER+ mais pas dans les ER- (Ruckhaberle et al., 2009). L'inhibition d'*UGT8* au niveau moléculaire dans des MDA-MB-231 a d'abord suggéré que le GalCer pouvait avoir un rôle pro-tumoral en lui-même (Owczarek et al., 2013). Il a été montré plus récemment qu'*UGT8* était une cible du facteur de transcription Sox10 dans des lignées de cancers « basal-like ». Son inhibition moléculaire ou par l'acide zoledronique dans ces lignées entraîne en fait une inhibition de la formation de Gal-Cer mais aussi du Sulfatide. Au final, la croissance tumorale plus élevée *in vivo* observée serait causée par le sulfatide. Il serait responsable d'une activation de l'expression de l'intégrine $\alpha V\beta 5$, de sa signalisation en aval et d'une prolifération des cellules avec un caractère invasif et migratoire plus important (Cao et al., 2018).

De la même façon qu'avec les céramides, des liposomes contenant du GlcCer et du GalCer ont été testé en incorporant des chimiothérapies dans les liposomes, ils permettent d'augmenter la libération de ces chimiothérapies dans les cellules cancéreuses (Pedrosa et al., 2013 ; Pedrosa et al., 2015).

La GBA1 peut être activée en réponse à une activation de la PKC δ et dégrader le GlcCer en céramide, principalement en Ceramide C16:0 (Kitatani et al., 2009). Curieusement, son inhibition semble induire de l'apoptose et restaurer une sensibilité des cellules tumorales aux chimiothérapies (Xiao Zhou biomedecine pharmacother 2017).

Il n'y a que très peu d'étude sur la lactosylcéramide en lui-même dans le cancer du sein. L'enzyme *B4GALT5* est plus exprimée dans les « basal-like » que les cancers luminaux A (Potapenko et al., 2015). En revanche, la composition des gangliosides est différente également entre la lignée MCF-7 et MDA-MB-231 (Nohara et al., 1998). Il a été montré que les cancers du sein exprimaient du GM3 qu'on ne retrouve pas dans du tissu sain (Marquina et al., 1996). A l'aide d'anticorps, il a été observé que les cancers de type TNBC exprimaient plus de GD2 que les luminaux A (Orsi et al., 2017). L'expression de la GD3 synthase est plus importante dans des cancers « basal-like » par rapport aux autres cancers et entraîne une accumulation de GD2 dans les cellules tumorales. La surexpression de la GD3 synthase s'accompagne d'une prolifération des cellules et d'une croissance tumorale accrue par un mécanisme dépendant de c-Met (Cazet et al., 2010). La signalisation par les oestrogènes entraîne une diminution de l'expression d'ARNm codant pour la GD3 synthase (Bobowski et al., 2013). Une forte expression du gène de la GD3 synthase est associée à un mauvais pronostic même en analyse multivariée (Ruckhaberle et al., 2009).

Les 2 gangliosides GD2 et GD3 peuvent aussi servir de marqueurs de CSC et il existe un métabolisme sphingolipidique différent entre les cellules non CSC et les CSC (Battula et al., 2012 ; Liang et al., 2013). Le GD3 favoriserait grâce à une interaction directe la phosphorylation de l'EGFR et tandis que GD2 interagit avec c-Met pour maintenir le phénotype souche des CSC (Liang et al., 2017).

Plusieurs stratégies utilisant des anticorps ou des vaccins ciblant les gangliosides ont été proposés comme thérapie ciblant la réponse immunitaire anticancéreuse (Fuentes et al., 2010 ; Ahmed et Cheung, 2014).

C. Immunité antitumorale

C.1 Généralités

En 1893, William Coley, après avoir observé que l'infection de patients atteints de sarcomes par des streptocoques pouvait entraîner une régression tumorale, publia qu'on peut obtenir des régressions tumorales sur le long terme en infectant volontairement des patients avec un sarcome incurable par la chirurgie. Il a remplacé plus tard l'utilisation de bactéries vivantes par des injections d'extraits bactériens obtenus par chauffage de *Streptococcus* et de *Serratia* (Coley, 1910). Mais le mode d'action des toxines de Coley, n'ayant pas de fondement théorique, elles sont abandonnées progressivement au profit des chimiothérapies et de la radiothérapie. En 1909, Paul Ehrlich suggéra que des cellules modifiées de l'organisme pouvaient être considérées comme étrangères par celui-ci et être ainsi éliminées. En l'absence de preuves expérimentales à cette époque, cette théorie n'a pas pu être reliée à l'action des toxines de Coley.

Plusieurs travaux ont mis en évidence la possibilité d'un contrôle de la tumeur par le système immunitaire chez la souris (Gross, 1943 ; Foley, 1953 ; Snell et al., 1953). Presque cinquante ans après Ehrlich, Frank Macfarlane Burnet a suggéré que des cellules cancéreuses pouvaient se développer en petite quantité, devenir antigéniques et être éliminées sans qu'il y ait apparition de signes cliniques de cancers (Burnet, 1957) et aboutit finalement à exposer ainsi le concept d'immunosurveillance (Burnet, 1971).

Cette théorie repose sur l'hypothèse selon laquelle le système immunitaire, et en particulier les lymphocytes T, joueraient un rôle de surveillance de l'organisme en reconnaissant les cellules néoplasiques comme étrangères et en les éliminant à un stade précoce, grâce à l'expression d'antigènes à leur surface. D'après ces théories, un cancer survient s'il y a échappement des cellules tumorales au système immunitaire. Cette théorie est longtemps restée controversée devant le centrisme sur la cellule tumorale, et ce malgré des évidences cliniques.

Cette notion d'immunosurveillance a évolué parallèlement aux progrès majeurs réalisés en Immunologie, et elle tend à se complexifier de plus en plus. On découpe maintenant la croissance tumorale en plusieurs phases. Après l'élimination des cellules tumorales durant la phase dite d'immunosurveillance, apparaît une phase d'équilibre pendant laquelle la tumeur commence à évoluer pour se protéger du système immunitaire. C'est durant cette phase, baptisée « immunoediting », où sous la pression du système immunitaire, que la tumeur acquiert des résistances, ou plutôt qu'un petit contingent de cellules résistantes au

système immunitaire initialement présentes ou non prennent le pas sur les autres et peuvent se développer. Puis, l'échappement au système immunitaire a lieu dans une troisième étape et la tumeur croit et devient cliniquement visible (Dunn et al., 2004)(Figure 11).

Le profil immunologique des tumeurs est variable d'un type de tumeurs à l'autre et même parfois au sein des mêmes pathologies tumorales (Thorsson et al., 2018). Malgré ces données en faveur d'un rôle du système immunitaire dans le contrôle des tumeurs, les tumeurs acquièrent des caractéristiques intrinsèques par mutation qui leur permettent de résister directement au système immunitaire. D'autres hypothèses suggèrent également qu'il y a aussi une modification du micro-environnement tumoral qui devient progressivement immunosuppresseur et permet à la tumeur de croître et d'être protégée du système immunitaire.

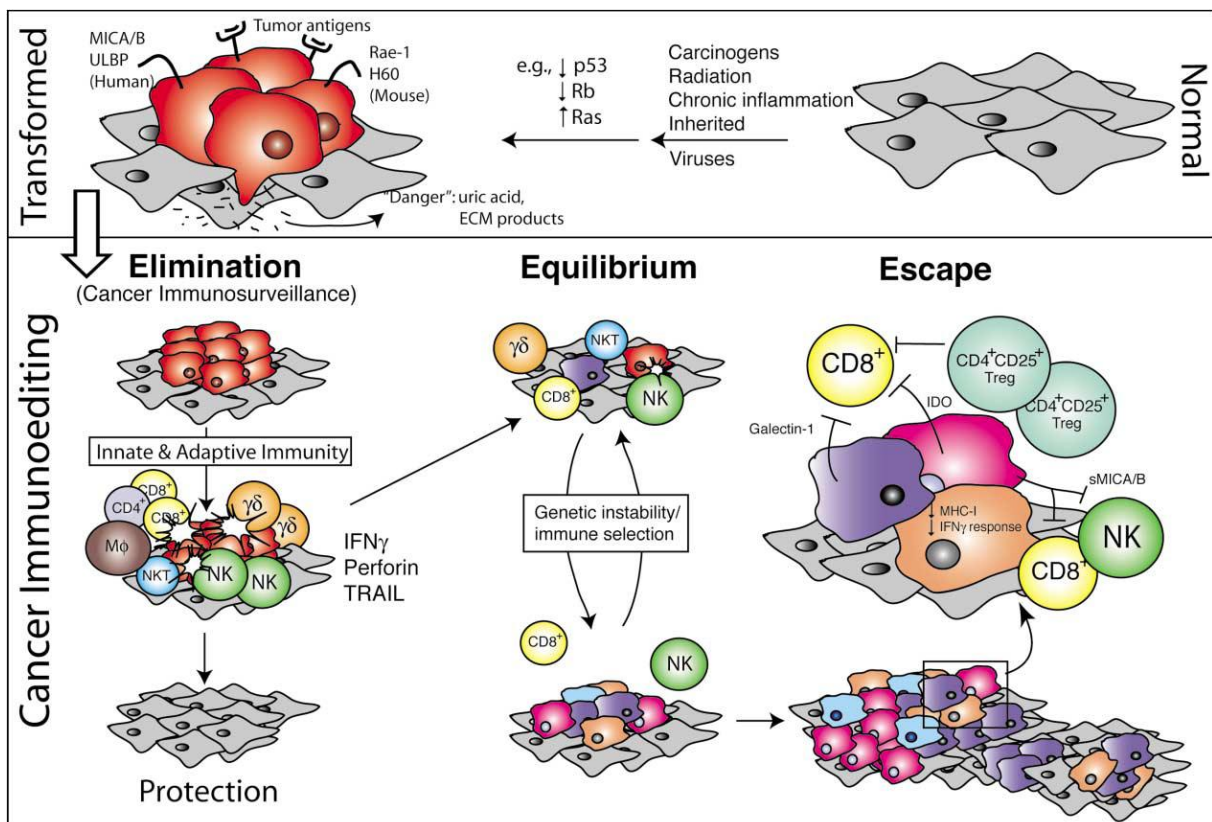


Figure 11
Les 3 phases de l'« immunoeediting » dans le cancer

Les cellules normales deviennent cancéreuses après un évènement oncogénique et induisent des signaux de dangers proinflammatoires. Si l'élimination n'est pas efficace dans la première phase, il s'ensuit un état d'équilibre (la deuxième phase). Lors de cette phase d'équilibre, les cellules tumorales peuvent rester et être maintenues ou transformées par le système immunitaire en populations variantes. Ces populations peuvent alors échapper au système immunitaire.

C.2 Réponse immunitaire et cancer du sein

C.2.1 Le microenvironnement tumoral

L'ensemble des éléments cellulaires (cellules immunitaires, endothéliales, stromales et le tissu adipeux) entourant les cellules tumorales est appelé microenvironnement tumoral. L'infiltrat immunitaire a une grande importance et la modulation de ce microenvironnement immunitaire peut impacter le développement des tumeurs et la réponse aux chimiothérapies (DeNardo et al., 2011).

Parmi les cellules composant l'infiltrat de l'immunité innée, on trouve les polynucléaires neutrophiles (PNN), les monocytes/macrophages, les lymphocytes Natural-Killer (NK), les lymphocytes T Gamma-Delta ($\gamma\delta$), les cellules dendritiques (DC) et les Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC). En ce qui concerne l'immunité adaptative, les principaux acteurs sont les ly T $CD8^+$ et les ly T $CD4^+$. Le rôle des lymphocytes B, bien que moins étudié, semble important pour initier une réponse immunitaire locale. Dans le cancer du sein, l'infiltrat immunitaire est majoritairement composé de ly T $CD4^+$ et $CD8^+$ (Ruffell et al., 2012)(Figure 12).

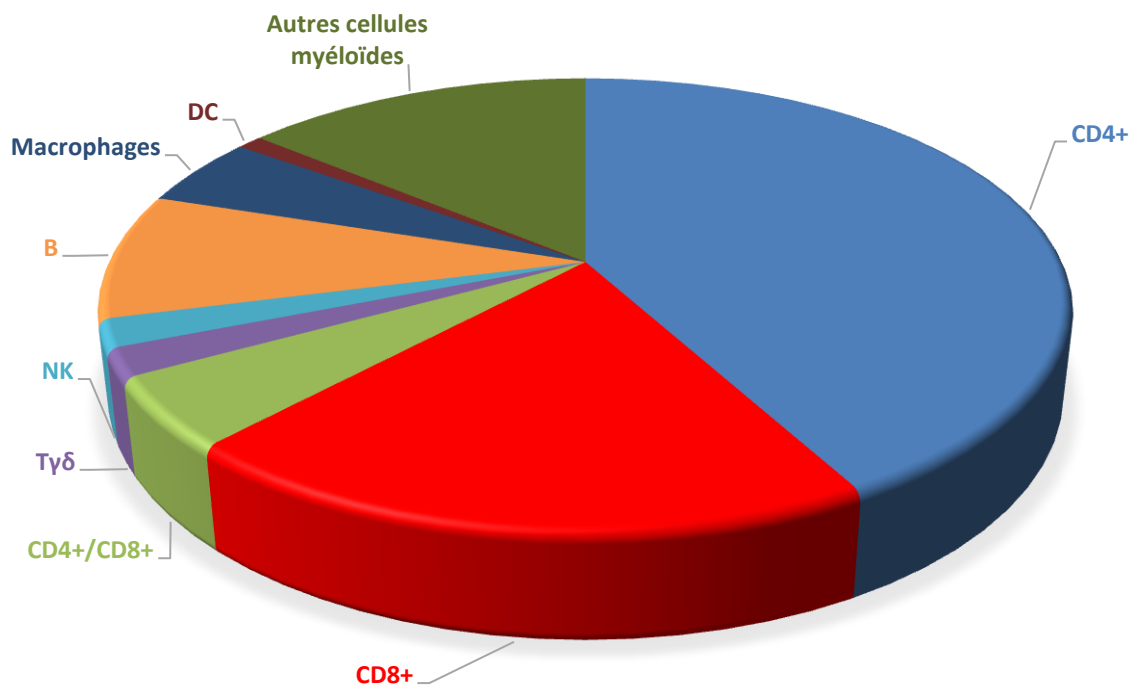


Figure 12
Répartition des différentes populations de leucocytes dans les tumeurs mammaires. Proportion des différents types de leucocytes retrouvés dans du tissu tumoral de cancer du sein (D'après Ruffell et al., 2012).

C.2.2 Impact pronostique des lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL)

Le premier moyen d'analyser l'infiltrat de TIL dans les cancers est une évaluation morphologique. L'examen des TIL sur une coupe tumoral coloré à l'hémalum/éosine permet de quantifier l'infiltrat de TIL dans le stroma et en intratumoral. C'est un biomarqueur associé à une réponse pathologique complète après chimiothérapie néoadjuvante dans plusieurs sous-types de cancer du sein et à une meilleure survie sans progression et une meilleure survie globale après chimiothérapie adjuvante dans les TNBC uniquement (Denkert et al., 2010). Il existe surtout une différence entre les tumeurs avec un infiltrat lymphocytaire prédominant (LPBC) (plus de 60% de TIL dans le stroma) qui ont un pronostic vraiment supérieur aux autres tumeurs (Loi et al., 2013).

Des progrès considérables ont été fait ces dernières années grâce au groupe coopératif « International Immuno-Oncology Biomarker Working Group » et ont permis d'arriver à standardiser l'évaluation de l'infiltrat de TIL (Salgado et al., 2015 ; Denkert et al., 2016). De manière générale, ce sont les TNBC qui ont un infiltrat immunitaire le plus abondant (Miyan et al., 2016). Dans les tumeurs RH+, un infiltrat important est associé avec une plus grande agressivité du cancer ce qui complique l'analyse de l'impact pronostique de l'infiltrat de TIL (Denkert et al., 2018).

Plusieurs autres études ont confirmé depuis l'intérêt de l'analyse des TIL comme marqueur pronostic après chimiothérapie adjuvante ou néoadjuvante (Solinas et al., 2017). Cependant, la prise en compte de la diversité au sein de l'infiltrat de TIL n'est pas faite avec ce type d'analyse.

C.2.3 Impact pronostique des sous population de TIL

L'analyse de la littérature concernant l'impact pronostique de différentes populations immunitaires T révèle que les cellules Th1, les cytokines qu'elles produisent, comme par exemple l'interféron- γ (IFN- γ) et les lymphocytes T CD8 et T mémoires qui sont associés à cette orientation immune sont corrélés à une bonne évolution clinique et ce, quel que soit le type de cancer étudié (

Figure 13). Cette observation n'est pas retrouvée pour les autres orientations immunitaires, Th2, Th17, ou T régulateurs (Treg), dans lesquelles la valeur pronostique est inconstante et versatile suivant le type de cancer et le stade d'évolution tumoral (Fridman et al., 2012) (Figure 13).

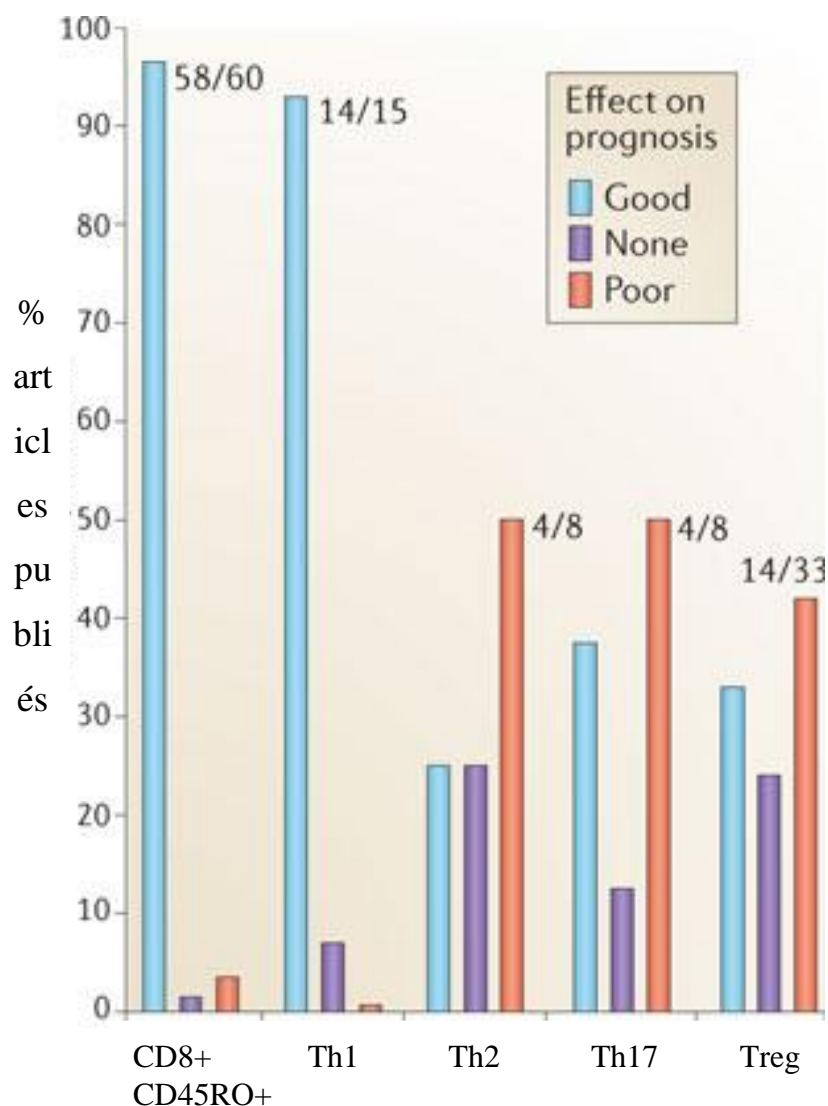


Figure 13

L'association de l'infiltrat de cellules immunitaires avec le pronostic de plusieurs types de cancers.

L'analyse de 124 articles publiés étudiant l'impact des sous-populations de lymphocytes T CD8 mémoires, des cellules T régulatrices (Treg) et des lymphocytes T : Th1, Th2 ou Th17 par rapport au pronostic de patients atteints de cancer (20 types de cancer différents ont été analysés) est représenté. «Good» signifie que ces cellules sont associées à un bon pronostic, «None» signifie qu'il n'y avait pas de corrélation et «Poor» signifie que ces cellules sont associées à un mauvais pronostic (D'après Fridman et al., 2012).

C.2.3.1 Les lymphocytes T CD8 cytotoxiques

Plusieurs études se sont focalisés sur l'infiltrat de T CD8⁺ mais les cohortes sont parfois limitées en taille et ne sont pas toujours comparables entre elles, de plus, les conclusions sont parfois contradictoires. La présence d'un infiltrat de TIL CD8⁺ important dans le stroma a été montrée comme associée à une meilleur survie (Mahmoud et al., 2011). L'infiltrat de TIL CD8⁺ aurait en réalité un impact pronostic seulement dans les cancers ER- (Baker et al., 2011 ; Ali et al., 2014) et à fortiori les TNBC (Liu et al., 2012 ; Miyashita et al.,

2015). La présence d'un infiltrat de CD8⁺ est également associée à une meilleure réponse à la chimiothérapie néoadjuvante (Oda et al., 2012 ; Seo et al., 2013).

Il existe différents sous-types de T CD8⁺ classés en fonction de leur degré de différenciation. Les naïfs sont les moins différenciés et vont donner après stimulation par une cellule présentatrice d'antigène des T « stem cell like memory » (T_{SCM}). Les centraux mémoires (T_{CM}) vont également recirculer et persister longtemps dans l'organisme ; les effecteurs mémoires RO⁺ (T_{EM}) et les effecteurs mémoires RA⁺ (T_{EFF}) vont être les plus cytotoxiques mais auront aussi tendance à devenir épuisés (« exhausted ») s'ils sont trop stimulés (Henning et al., 2018).

Des données récentes suggèrent que ce ne sont pas les T CD8⁺ dans leur ensemble mais les T CD8⁺ CD103⁺, aussi appelés T résidents mémoires (T_{RM}) CD8⁺ qui sont les effecteurs dans la tumeur et qui sont associés à un bon pronostic (Wang et al., 2016 ; Savas et al., 2018).

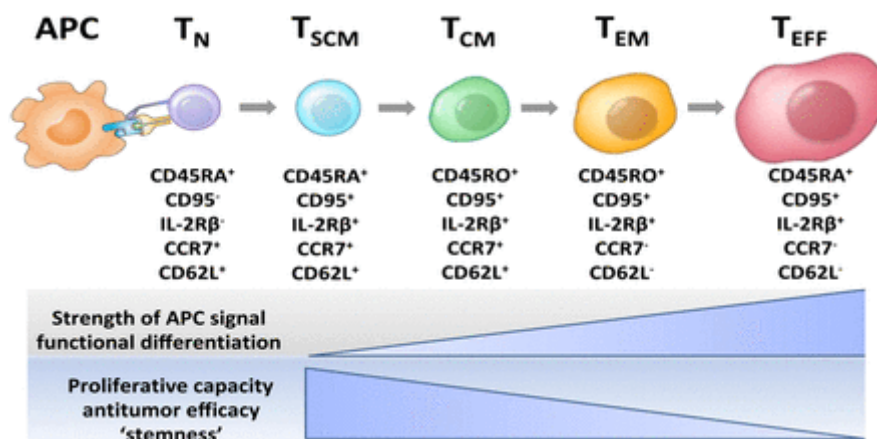


Figure 14

Modèle de différenciation linéaire des lymphocytes T CD8⁺. Les différents stades de différenciation depuis le lymphocyte naïf jusqu'au lymphocyte T effecteur RA⁺. Le signal donné par la cellule présentatrice doit être plus long et fort pour arriver à un stade de différenciation plus avancé, les capacités de prolifération des CD8 diminuent en se différenciant (D'après Restifo, 2014).

C.2.3.2 Les lymphocytes Th1

Les Th1 sont importants pour induire une réponse immunitaire durable par les CD8 dans un modèle de cancer du sein HER2⁺ (Moeller et al., 2007). La détection de Tbet, le facteur de transcription des Th1, dans des tumeurs HER2⁺ est associée à une meilleure réponse au Trastuzumab (Ladoire et al., 2011). Après traitement néoadjuvant au trastuzumab, les patientes répondeuses ont une production d'IFNγ par les CD4, en réponse à une stimulation par un peptide spécifique, plus importante que les patientes non répondeuses (Datta et al., 2015). La plus forte expression du marqueur Tbet aussi été associé à bon

pronostic dans une cohorte de 614 patientes avec plusieurs types de cancers. La présence d'une forte expression de Tbet était plus souvent visible dans les cancers de types TNBC (Mulligan et al., 2015).

C.2.3.3 Les lymphocytes Th2

Les lymphocytes Th2 ont un rôle opposé au Th1 dans le cancer du sein. L'analyse du liquide interstitiel de tumeurs mammaires montre une plus grande production de cytokines de types 2 par rapport à du tissu sain. Une faible concentration en IL-5, une cytokine produite par les Th2, est associée à une meilleure survie chez des patientes atteintes de cancer du sein (Espinoza et al., 2016). Dans un modèle murin spontané, ils vont faciliter l'apparition de métastases en favorisant la polarisation des macrophages M2 (DeNardo et al., 2009). Les Th2 vont aussi limiter également l'efficacité de la radiothérapie (Shiao et al., 2015). Les mécanismes régulant l'infiltration des Th2 et leurs fonctions dans la tumeur sont peu connus mais font vraisemblablement intervenir un contact avec certaines cellules myéloïdes. Le GM-CSF produit par les cellules tumorales ayant un phénotype métastatique peut induire une activation des pDC biaisée pour favoriser la différenciation de T CD4⁺ naïfs en Th2 au contact de ces pDC (Ghirelli et al., 2015). Il existe une corrélation entre la chimiokine CCL5, le taux d'IL-4 et le stade des tumeurs humaines. CCL5 active la différenciation des Th2 en activant le récepteur CCR3. Dans un modèle murin déficient en CCL5 il y a une perturbation de la différenciation des TAM et des MDSC qui a pour conséquence de réduire la différenciation des Th2 (Zhang et al., 2015).

C.2.3.4 Les lymphocytes Treg

Les Treg sont une sous-population de T CD4⁺ caractérisés par l'expression du facteur de transcription Forkhead box P3 (Foxp3). Les Treg dérivés du thymus sont appelés Treg naturels (nTreg). Ils peuvent également être induits (iTreg) en périphérie en réponse à la présence de TGF- β , d'IL-10 et d'IL-35. Un marqueur de surface des Treg est la chaîne alpha du récepteur de l'IL-2 (CD25). L'IL-2 est importante pour leur survie et leur homéostasie. Les Treg jouent un rôle clé dans le maintien de la tolérance périphérique ; ils constituent une protection contre le développement de maladies autoimmunes en supprimant la fonction des LT auto réactifs par des interactions cellule-cellule et la libération de cytokines suppressives, telles que le TGF- β , l'IL-10 et l'IL-35. Cependant dans un contexte tumoral, ces cellules

favorisent la progression du cancer en supprimant l'immunité anti-tumorale (Tanaka et Sakaguchi, 2017) (Figure 15).

L'infiltration tumorale par des Treg à l'aide du marqueur FoxP3 a été montrée initialement comme associée avec un mauvais pronostic (Bates et al., 2006), et augmente dans les stades plus avancés des tumeurs (Schreiber, 2007). Cependant des études plus récentes ont montré que dans les cancers du sein RH-, l'infiltrat de Treg était associé à un meilleur pronostic (Ladoire et al., 2011 ; West et al., 2013 ; Yeong et al., 2017). Il semble que dans les cancers du sein RH-, une augmentation de l'infiltrat de Treg soit aussi accompagnée par une augmentation de l'infiltrat de CD8.

Le ratio entre les CD8 et les Treg FoxP3+ a aussi été montré comme étant un facteur de bon pronostic (Liu et al., 2011) et un facteur associé avec une réponse complète en cas de chimiothérapie néoadjuvante. Par ailleurs, il a été observé une diminution des Treg dans la tumeur après chimiothérapie qui entraîne une augmentation du ratio CD8/FoxP3, et qui est associée avec la réponse aux chimiothérapies néoadjuvante (Ladoire et al., 2008 ; Kaewkangsan et al., 2016).

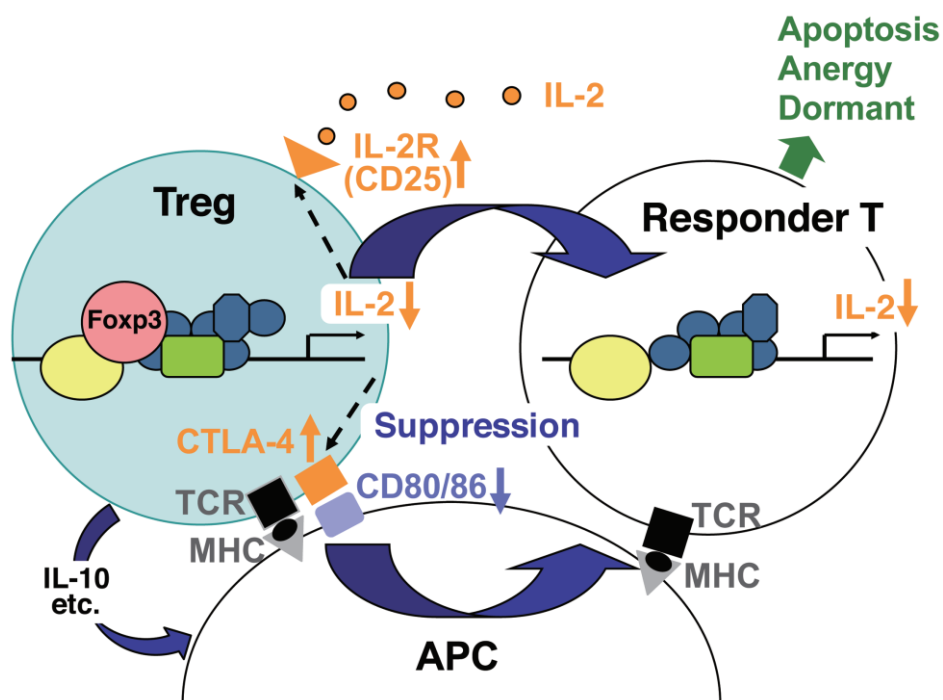


Figure 15
Mécanismes immunosuppresseurs des Treg. Les Treg produisent peu d'IL-2 mais privent les populations de T répondeurs en IL-2 car ils expriment fortement le récepteur de haute affinité pour l'IL-2 (CD25). Ils expriment constitutivement CTLA-4 et réduisent l'expression des molécules de costimulation CD80/86 par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) accessibles aux T répondeurs. Ils produisent de l'IL-10 qui réduit l'activation et les fonctions des APC. Dans ces conditions, la stimulation d'un TCR de haute affinité, d'affinité intermédiaire ou basse par les APC induit respectivement l'apoptose l'anergie ou la dormance des T répondeurs (D'après Tanaka et Sakaguchi, 2017)

C.2.3.5 Les lymphocytes Th17

Les Th17 sont une sous-population de LyT CD4⁺ découverte plus récemment et qui ont un rôle dans la défense contre les bactéries extracellulaires et les champignons. Les Th17 sont associés à un mauvais pronostic dans le cancer du sein (Chen et al., 2013). Le lien entre les Treg et les Th17 dans le cancer du sein n'a été fait que récemment. Il a été mis en évidence que des lymphocytes Treg FoxP3⁺ pouvaient exprimer le récepteur CCR6, qui caractérise normalement les Th17 (Xu et al., 2010). Il a aussi été observé une corrélation positive entre l'expression de FoxP3, de RORc et de l'IL17 dans des tumeurs mammaires (Benevides et al., 2013). En réalité, il existerait plutôt une population de lymphocytes Th17 CCR6⁺ dans les tumeurs mammaires qui expriment FoxP3, qui produisent de l'IL-17, qui expriment les ectonucléotidases CD39 et CD73 et favorisent un environnement immunosuppresseur via la production d'adénosine (Thibaudin et al., 2016).

C.2.3.6 Les lymphocytes Tfh

L'infiltration par des Tfh, qui sont normalement présents dans les centres germinatifs (GC) et aident à la maturation d'affinité et à la commutation de classe des lymphocytes B, a été montré comme prédictive de la survie globale dans le cancer du sein. Cette infiltration par les Tfh s'accompagne également de la formation de structures lymphoïdes tertiaires (TLS) (Gu-Trantien et al., 2013).

C.2.4 Circulation des TIL dans les tumeurs

Les mécanismes permettant aux TIL d'entrer et de persister dans la tumeur sont encore mal connus. La réaction inflammatoire locale permettrait d'attirer des cellules immunitaires notamment par la production de chimiokines. Par exemple, les LyT CD8⁺, les NK et les Th1 expriment le récepteur CXCR3 qui est sensible aux chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11. La migration des CD8 dans la tumeur est augmentée par l'effet de l'IFN γ et du TNF α qui sont des inducteurs de l'expression des ligands de CXCR3 (Hensbergen et al., 2005 ; Mulligan et al., 2013). De façon opposée, les Treg avec le récepteur CCR4, sont attirés par les chimiokines CCL17 et CCL22 (Mizukami et al., 2008 ; Gobert et al., 2009). Une autre étude suggère que les T naïfs recrutés par CCL18 se différencient ensuite en Treg dans la tumeur (Su et al., 2017).

La vascularisation est un autre point important permettant aux TIL de pénétrer dans la tumeur. Il existe de nombreuses anomalies de la vascularisation dans les tumeurs entraînant

une néoangiogénèse anarchique. Certains types de vaisseaux semblables à ceux rencontrés dans les organes lymphoïdes, les « high endothelial veinules » (HEV), serviraient de porte d'entrée dans les tumeurs pour les TIL. Il a été montré une corrélation entre leur présence et l'importance de l'infiltrat T et B (Martinet et al., 2011). De façon intéressante, la déplétion en Treg permet d'augmenter la génération des HEV dans les tumeurs, suggérant que les Treg n'ont pas qu'une action directe sur les cellules cytotoxiques (Hindley et al., 2012).

Même si une réaction immunitaire locale a lieu, la persistance de TIL dans les tumeurs est aussi lié à un mécanisme indépendant d'un antigène mais dépendant des caractéristiques de la tumeur (Olurinde et al., 2011).

C.2.5 Immunothérapie dans le cancer du sein

Plusieurs approches d'immunothérapies sont possibles et ont été testées dans le cancer du sein. Elles reposent sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux, de vaccins ou de thérapies cellulaires.

C.2.5.1 Vaccins

La vaccination contre le cancer a pour but de monter une réponse immunitaire efficace contre le cancer. Le préalable à l'utilisation des vaccins est la détermination d'antigènes associés aux tumeurs. En dehors du récepteur HER2 surexprimés, plusieurs autres antigènes ont été identifiés dont la mucine-1 (MUC1) et l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) (Criscitiello, 2012). Les essais de vaccination anti-HER2 associés au GM-CSF (vaccin GP2 et AE37) ont montré une tendance à être supérieur par rapport au GM-CSF seul (Mittendorf et al., 2016 ; Mittendorf et al., 2016). Les essais de vaccins anti-MUC-1 (Theratope) ont montré un léger bénéfice en combinaison avec une hormonothérapie (Ibrahim et al., 2013). Le vaccin PANVAC (CEA, MUC-1) en combinaison avec le docétaxel a montré une augmentation non significative de 7,9 mois contre 3,9 mois dans le groupe sans vaccin de la survie globale chez des patientes avec un cancer du sein métastatique (Heery et al., 2015). Ces essais ont montré dans tous les cas que les vaccins étaient bien tolérés.

C.2.5.2 Transfert adoptif de cellules T

La thérapie cellulaire avec l'utilisation de lymphocytes T exprimant un récepteur chimérique « CAR-T cells » a été testée et semble réalisable.

Les premiers essais ont été réalisés avec des CAR-T cells dirigés contre HER2. Des effets secondaires très sévères après l'administration du traitement suivi par le décès de la première patiente ont entraîné un arrêt précoce de l'étude (Morgan et al., 2010).

Dans un essai sur 6 patientes, dont 4 TNBC, avec des CAR-T cells dirigés contre la mesothéline (c-Met), il a été observé une réduction de l'expression de c-Met dans les tumeurs chez les patientes. La perte de l'expression de ce marqueur pourrait néanmoins rendre les cellules cancéreuses moins agressives en les privant de cette signalisation (Tchu J cancer immunol res 2017).

Un autre antigène TEM8 a servi de cible pour des CAR-T cells. TEM8 est surtout exprimé dans les TNBC et par les cellules souches cancéreuses. L'injection de TEM8-CAR T cells induit une régression tumorale et une diminution des métastases pulmonaires dans un modèle préclinique avec 2 xénogreffes dérivés de patients (PDX). (Byrd TT, cancer res 2018)

C.2.5.3 Inhibiteurs de checkpoint immunitaires

Les tumeurs vont résister au système immunitaire grâce à l'expression de récepteur inhibiteurs. Les tumeurs mammaires peuvent exprimer les ligands PD-L1 et/ou PD-L2 à leur surface et inhiber l'activation par le TCR des lyT CD8⁺ en se liant à PD-1.

Les essais d'immunothérapies seules n'ont pas eu d'effets très importants dans les cancers du sein. L'utilisation d'un anti PD-L1 a donné seulement 4,8% de réponse globale avec 2,8% pour les ER+, 3,8% pour les HER2+ et 8,6% pour les TNBC (Dirix et al., 2018). Le même anticorps a donné 10% de réponse globale dans des TNBC métastatiques, avec 13% de réponse globale pour les TNBC PD-L1+ contre 5% pour les PD-L1-, et 26% de réponse en première ligne de traitement contre 4% en deuxième ligne (Schmid et al., 2017).

L'utilisation de l'anti-PD-1 Pembrolizumab dans des cancers du sein ER+HER2- et PD-L1+ n'a donné une réponse durable que chez 2 patients sur 25 dans l'étude KEYNOTE-028 (Rugo et al., 2018). En prenant uniquement des TNBC métastatiques exprimant PD-L1, l'utilisation d'un anti-PD-1 donnait 18,5% de réponse globale (Nanda et al., 2016). Dans l'étude KEYNOTE-086, le Pembrolizumab utilisé pour des TNBC métastatique sans sélection sur le niveau d'expression de PD-L1 donnait 4,7% de réponse globale dans la cohorte où le Pembrolizumab était utilisé après un échec de traitement et 23% de réponse globale en première ligne de traitement (Adams et al., 2017 ; Adams et al., 2017).

La plupart des études montrent que les ICI sont plus efficaces dans les TNBC et qu'ils sont moins efficaces après un premier échec de chimiothérapie

C.2.5.4 Chimiothérapies immunogènes et immunothérapies

L'efficacité des chimiothérapies conventionnelles a été mise sur le compte de leur action létale directe sur les cellules tumorales, mais les travaux sur le rôle pronostique de l'infiltration des lymphocytes dans les cancers suggèrent que les chimiothérapies interviennent aussi dans la réponse immunitaire. La mort immunogène (« Immunogenic cell death », ICD) s'accompagne du relargage d'ATP, d'annexine A1, d'HMGB1 et de l'exposition de calréticuline à la surface des cellules tumorales. Ce type de mort cellulaire entraîne une réponse inflammatoire avec la production d'IFN γ et de CXCL10 qui active les cellules dendritiques dans la tumeur pour qu'elles puissent aller activer les lymphocytes T CD8⁺ (Galluzzi et al., 2017). Certaines chimiothérapies comme les sels de platines, la doxorubicine sont des inducteurs de mort immunogène (Galluzzi et al., 2015). Actuellement, plusieurs essais de combinaison d'immunothérapies avec des chimiothérapies ou des thérapies ciblées sont à l'étude dans le cancer du sein pour en potentialiser les effets (Polk et al., 2018) (Figure 16).

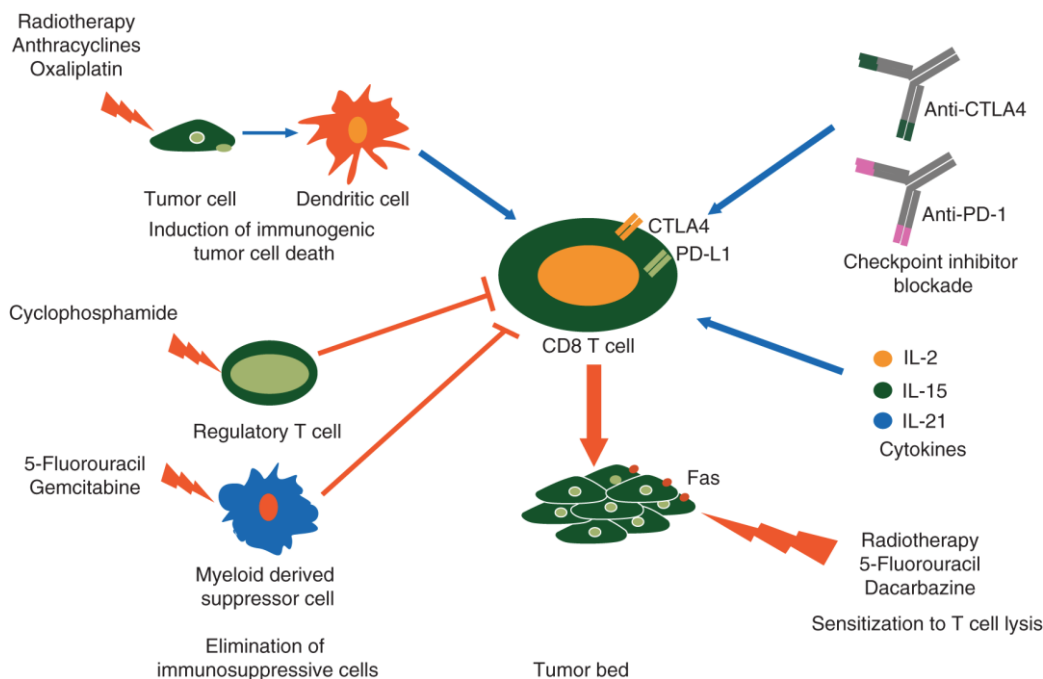


Figure 16

Bases moléculaires pour le rationnel de la combinaison d'immunothérapies avec des anticancéreux.

Les chimiothérapies classiques peuvent induire (i) de la mort immunogène, (ii) éliminer des cellules immunosuppressives et (iii) sensibiliser les cellules tumorales aux cellules immunitaires effectrices. Les cytokines immunoactivatrices et les inhibiteurs de checkpoint immunitaires renforcent l'activation des CD8 et empêchent l'apparition de dysfonction au sein du microenvironnement. (D'après Apetoh et al., 2015)

C.3 Sphingolipides et immunité

Les sphingolipides sont des composants pouvant moduler les réponses immunitaires en agissant sur la signalisation cellulaire mais certains sphingolipides ont également des propriétés antigéniques.

C.3.1 Céramide

Le céramide va jouer un rôle dans la signalisation du TCR et l'activation des lymphocytes T. Il a également un rôle dans les fonctions des DC.

C.3.1.1 Céramide et signalisation des Ly T

Des études sont en faveur d'un rôle inhibiteur de la sphingomyélinase ou du céramide sur la prolifération des lymphocytes T en réponse à une stimulation du TCR (O'Byrne et Sansom, 2000). Dans un contexte d'activation de la sphingomyélinase acide par le TNF- α , la production de céramide inhibe le signal calcique des lymphocytes T (Church et al., 2005). L'utilisation de C2-céramide inhiberait la signalisation du TCR en perturbant la signalisation calcique et les canaux potassiques (Detre et al., 2006). Cet effet pourrait passer par une inhibition des PKC dans un contexte où l'activation des lymphocytes n'est pas faite par le TCR (Abboushi et al., 2004).

D'autres études sont plutôt en faveur d'un rôle positif du céramide lors de l'activation du TCR. Le céramide va jouer un rôle important dans la structuration des microdomaines ou des rafts lipidiques. L'inhibition de la synthèse de céramides va perturber aussi la signalisation du TCR (Tonnetti et al., 1999). L'inhibition de CerS6 semblerait surtout responsable d'une mauvaise signalisation du TCR car elle entraîne une moins bonne activation des lymphocytes T par des allo-antigènes dans un modèle murin. Les lymphocytes T ne génèrent pas suffisamment de céramide C16 dans ce modèle (Sofi et al., 2017). A une étape ultérieure, dans le métabolisme, l'activité SMS1 qui génère de la sphingomyéline à partir de céramide dans l'appareil de Golgi entraîne aussi un défaut d'accumulation de sphingomyéline à la membrane plasmique et un défaut d'activation par le TCR des Ly T (Jin et al., 2008).

La stimulation du TCR induit l'activation de la sphingomyéline neutre (nSMase), la dégradation de la SM et l'activation de la voie des MAPK et de la production d'IL-2 en aval (Tonnetti et al., 1999). Des études plus récentes ont montré que la nSMase2 jouerait un rôle

dans la signalisation du TCR en favorisant la polarisation du centre organisant des microtubules (MTOC) à la synapse immunologique et en favorisant la signalisation soutenue du TCR de cette façon (Bortlein et al., 2018). L'activation de la nSMase2 jouerait aussi un rôle dans la migration lymphocytaire en permettant aux lymphocytes d'exposer la forme de haute affinité de l'intégrine LFA1 (Collenburg et al., 2017). Il avait été montré auparavant que le céramide produit après l'activation de la SMase acide permettait le « clustering » d'ICAM1, le ligand de LFA1 sur les cellules endothéliales pour faciliter la migration transendothéliale (Lopes Pinheiro et al., 2016).

La co-stimulation de CD28 active aussi la sphingomyélinase acide qui entraîne la production de céramide (Boucher et al., 1995) et favorise la libération d'IL-2 dans le milieu extérieur par les lymphocytes T (Stoffel et al., 1998). Il est possible que le rôle de la SMase acide soit de favoriser la sécrétion de cytokines. Dans les Ly T CD8⁺, il a été montré que la SMase acide participait à la fusion des granules cytotoxiques et à la libération de perforine et de granzymes (Herz et al., 2009).

C.3.1.2 Céramide et Ly T CD4⁺

Plusieurs études supportent un rôle du céramide dans les fonctions et la différenciation des Ly T CD4⁺. L'ajout de C6-Céramide mais pas d'autres types de céramides favorise la production d'IFN- γ et la différenciation de lymphocytes T naïfs en Th1 (Kue et al., 2012). La même équipe a montré que le C6-Céramide potentialisait aussi la différenciation de lymphocytes T CD4 en Treg en combinaison avec du TGF- β (Kue et al., 2013). Il semble que les Treg ont une expression plus forte de la SMase acide et accumulent plus de céramide à leur membrane que les T conventionnels. Ils seraient moins sensibles à l'inhibition de la SMase acide que les T conventionnels, l'inhibition pharmacologique de la SMase acide entraîne une accumulation des Treg effecteurs dans les organes lymphoïdes secondaires (Hollmann et al., 2016). Une autre étude montrait que les Treg étaient plus nombreux chez des souris déficientes en SMase acide que de souris sauvages, mais que l'ajout de céramide exogène réduisait quand même les capacités de prolifération des Treg (Zhou et al., 2016).

L'inhibition pharmacologique ou moléculaire de la SMase acide réduit la prolifération des Ly T CD4⁺ mémoires et inhibe la différenciation en Th1, Th2 et Th17 (Bai et al., 2015). L'inhibition de la différenciation des Th17 en l'absence d'activité SMase acide serait due à un défaut d'activation de STAT3 et de la voie AKT/mTOR (Bai et al., 2014). Toutes ces études

suggèrent un rôle de la SMase acide dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des différentes populations de Ly T auxiliaires.

C.3.2 Glucosylcéramides

Les glycosphingolipides vont avoir des propriétés antigéniques particulières, ce qui en fait des cibles potentielles pour l'immunothérapie des cancers.

Les cellules dendritiques ont une fonction de présentation antigénique des glycolipides par la molécule CD1d et ainsi d'activer une population particulière de Ly T avec un TCR invariant, les NKT (Arora et al., 2014). Les NKT sont normalement activés par l' α -GalCer mais qui n'est pas présent naturellement chez l'homme. D'autres ligands que l' α -GalCer comme le sulfatide (Stax et al., 2017), ou des ligands non glycosylés peuvent cependant aussi activer les NKT (Silk et al., 2008).

Des thérapies cellulaires basées sur les NKT ont été testées dans des modèles précliniques de cancer du sein (Gebremeskel et al., 2017). Chez l'homme un essai de thérapie cellulaire basé sur l'injection de NKT a été réalisé chez des patients atteints de mélanome métastatique (Exley et al., 2017).

De manière plus large, l'utilisation d'immunothérapies dirigés contre les gangliosides GD2 ou le GM3 ont déjà été utilisés dans divers cancers mais avec des succès relatifs dans des petites séries de patients (Mulens et al., 2010 ; Gargett et al., 2016 ; Valdes-Zayas et al., 2017). La combinaison avec d'autres immunothérapies ou chimiothérapies est nécessaire avant de pouvoir les utiliser à plus grande échelle.

C.3.3 S1P et S1PR

C.3.3.1 Gradient de S1P

La S1P est présente à des concentrations différentes dans le corps humain. Dans le plasma, on trouve les plus fortes concentrations en S1P, allant de quelques μ M à quelques centaines de nM. Dans la lymphe, on retrouve des concentrations environ 75% plus faibles que dans le sang. A contrario, dans les tissus, les concentrations en S1P sont très faibles de l'ordre du pmol/mg. Il en résulte un gradient de concentration qui joue un rôle notamment pour le trafic lymphocytaire.

Dans les tissus, la baisse du taux de S1P semble très liée à l'activité SPL, qui est essentielle pour maintenir le gradient de S1P, la localisation de la SPL au niveau du réticulum

endoplasmique (RE) en fait plutôt un régulateur en aval de la production de S1P (Bektas et al., 2010).

Dans la circulation, la S1P proviendrait principalement des érythrocytes, des plaquettes et des cellules endothéliales. La part des globules rouges est majoritaire puisque des souris *SphK2*^{-/-} irradiées reconstitués avec de la moelle osseuse avec un KO conditionnel de *SphK1* n'ont plus de S1P circulante (Pappu et al., 2007). De plus, les taux de S1P circulante sont fortement corrélés aux paramètres de la numération sanguine (Bode et al., 2010). Les plaquettes, qui sont dépourvues de SPL, mais ont une forte activité sphingosine kinase sont aussi une source de S1P, cependant leur rôle serait plutôt de libérer des grandes quantités de S1P pour aider à la cicatrisation et activer la coagulation. Les plaquettes libèrent de la S1P sous l'effet de la thrombine et la S1P favorise le relargage de facteurs solubles par les cellules endothéliales stimulées par la thrombine (Takeya et al., 2003).

Les cellules endothéliales sont une source de régulation de la S1P, elles ont à la fois une activité de synthèse et de dégradation de la S1P. Elles seraient capables de libérer des faibles quantités de SK1 dans la circulation ce qui participerait à la synthèse de S1P (Ancellin et al., 2002) et ont aussi une localisation de SK1 à la membrane préférentiellement du côté luminal (Venkataraman et al., 2006).

Le maintien du gradient dans les organes lymphoïdes est indispensable à la circulation des lymphocytes et est dépendant de plusieurs enzymes dont la SPL (Schwab et al., 2005 ; Zamora-Pineda et al., 2016) , et les Sphk1 et 2 (Pham et al., 2010). Les LPP (pour « lipid phosphate phosphatases »), des enzymes transmembranaires à activité extracellulaire ont aussi un rôle dans la dégradation de la S1P et des phospholipides. La LPP3 exprimée par les cellules épithéliales et endothéliales dans le thymus est notamment impliquée dans le contrôle du gradient de S1P (Breart et al., 2011). Curieusement CerS2 permettrait aussi de réguler le gradient de S1P et la migration des thymocytes (Rieck et al., 2017). Enfin, l'expression du transporteur Spns2 dans les cellules endothéliales est aussi essentielle au maintien du gradient de S1P dans les organes lymphoïdes secondaires (SLO) (Fukuhara et al., 2012 ; Mendoza et al., 2012). De manière intéressante, les souris *Spns2*^{-/-} présentent une altération partielle du taux plasmatique de S1P (Donoviel et al., 2015) qui se traduit par une l'altération du trafic lymphocytaire avec une diminution de la fréquence des lymphocytes dans la circulation et une augmentation des LT matures dans le thymus et des LB matures dans la moelle osseuse (Fukuhara et al., 2012 ; Nijnik et al., 2012). Une étude a révélé que *Spns2* ne semble pas être impliqué dans la libération de S1P par les cellules sanguines et a suggéré un rôle pour *Spns2*

dans d'autres cellules. En effet, la délétion spécifique de Spns2 dans les cellules endothéliales entraîne des anomalies de sortie des lymphocytes similaires à celles observées chez les souris Spns2^{-/-}. Ces données suggèrent que Spns2 fonctionne dans les cellules endothéliales pour établir le gradient de S1P requis pour la sortie des LT et LB matures de leurs organes lymphoïdes primaires respectifs.

Il est intéressant de noter que la délétion de Spns2^{-/-} entraîne une réduction importante des métastases pulmonaires après l'injection de divers types de cellules cancéreuses (cancer du poumon CMT-167, colorectal MC-38 ou encore cellules cancéreuses du sein EO771.LMB) en i.v. chez la souris. Les souris Spns2^{-/-} présentaient également moins de métastases pulmonaires spontanées après l'administration sous-cutanée de cellules de mélanome HCmel12-mCherry. En revanche, il n'y avait aucune différence de croissance de la tumeur primaire entre les souris de type sauvage et Spns2^{-/-}. La diminution de l'invasion est associée à une lymphopénie et à une augmentation de l'infiltration des LT et des NK dans les poumons, améliorant ainsi la destruction des cellules tumorales ce qui explique la diminution de la charge métastatique chez les souris Spns2^{-/-} (van der Weyden et al., 2017).

C.3.3.2 Récepteurs à la S1P

Les récepteurs à la S1P exprimés ne sont pas tous les mêmes dans les différentes sous-populations de cellules immunitaires (Figure 17). Le rôle de la S1P et des S1PR dans le système immunitaire a été mis fortement en avant avec la découverte du Fingolimod (Gilenya®) ou FTY720.

C.3.3.2.1 S1P/S1P1 et migration lymphocytaire T

La S1P dans le système immunitaire a été principalement étudiée pour son rôle dans le trafic lymphocytaire T. Le FTY720 est un analogue structural de la sphingosine, qui peut agir comme agoniste sur les récepteurs S1P1, 3, 4 et 5, et avec à forte doses peut agir comme antagoniste fonctionnel du S1P1 en induisant son internalisation et sa dégradation. Il a d'abord été utilisé comme immunosuppresseur dans des modèles précliniques de transplantation en pensant qu'il induisait l'apoptose des lymphocytes T.

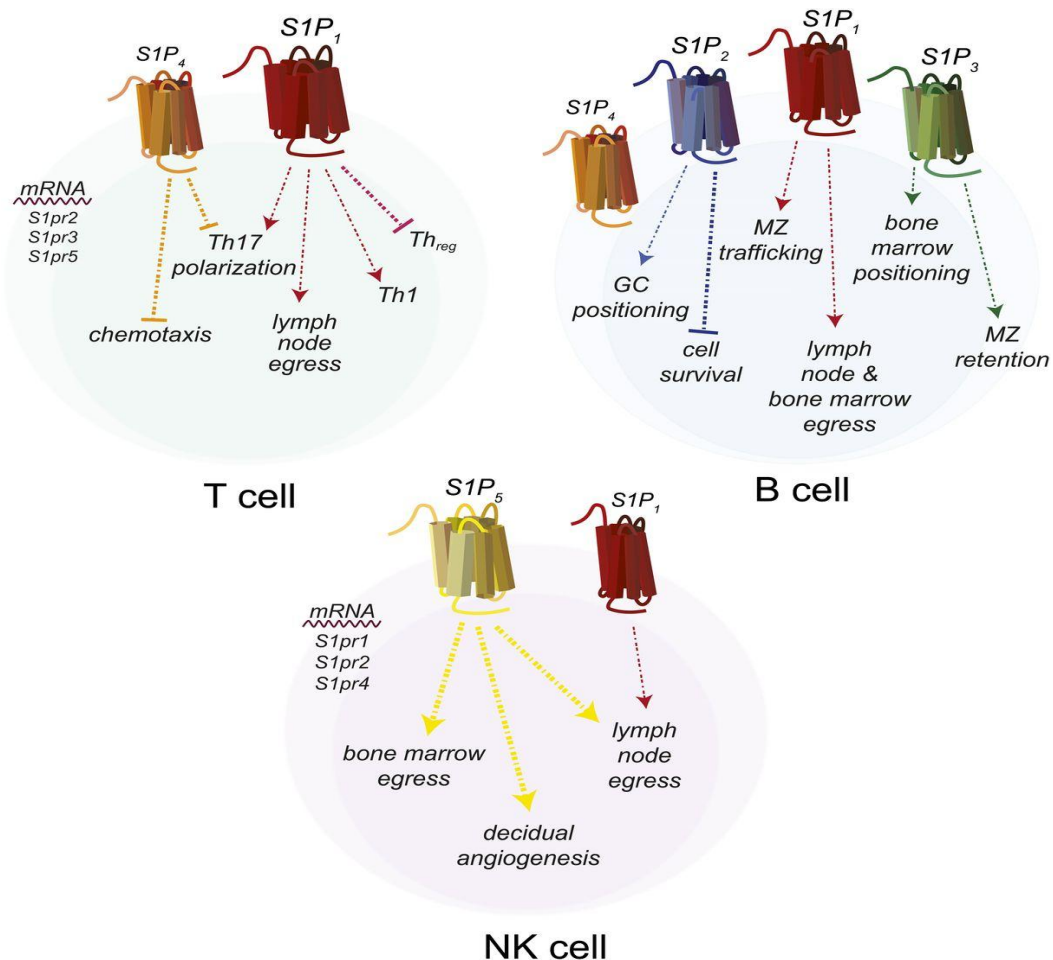


Figure 17

Expression des S1PR et de leurs fonctions sur les cellules lymphocytaires.

Les lymphocytes T expriment S1P1 et S1P4, les lymphocytes B expriment S1P1, S1P2, S1P3 et S1P4, les NK expriment S1P1 et S1P5. Les lymphocytes n'expriment pas forcément tous les S1PR illustrés au même moment, mais peuvent avoir une expression variant en fonction des stades de maturation ou d'activation. (D'après Blaho et Hla, 2014)

Le FTY720 a une autorisation d'utilisation dans la Sclérose en plaque (SEP), une maladie auto-immune du système nerveux central (SNC). En 2002 l'action du FTY720 sur les récepteurs à la S1P a été découvert en analysant l'effet de ses métabolites (Mandala S, science 2002). Il agit comme un immunosuppresseur car le FTY720 phosphorylé entraînant la dégradation du récepteur S1P1 par le protéasome (Oo et al., 2007). Le mode d'action principal du FTY720 va être de séquestrer les lymphocytes naïfs et centraux mémoires dans les organes lymphoïdes secondaire, il y'a donc une lymphopénie périphérique (Chiba et al., 2006 ; Mehling et al., 2008).

Il est clairement établi que le récepteur S1P1 est important pour la sortie des lymphocytes du thymus et des organes lymphoïdes (Matloubian et al., 2004). L'utilisation d'un KO conditionnel de *S1pr1* dans les lymphocytes T a permis de confirmer ce rôle

spécifiquement dans la migration des thymocytes (Allende et al., 2004). L'expression du récepteur S1P1 dans les thymocytes et les lymphocytes est sous le contrôle du facteur de transcription « Kruppel-like factor 2 » (KLF2) (Carlson et al., 2006 ; Bai et al., 2007). Ces résultats obtenus chez la souris ont été confirmés chez l'homme où les thymocytes matures expriment également *S1PR1* et *KLF2* et répondent mieux à la S1P pour migrer par rapport aux thymocytes plus immatures (Resop et al., 2016). La stimulation d'ICOS régule négativement l'expression de KLF2 et de S1PR1 dans les Tfh (Lee et al., 2015 ; Weber et al., 2015). Ceci est à mettre en relation avec le rôle essentiel de S1P2 pour la localisation des Tfh dans les GC (Moriyama et al., 2014). Enfin, le récepteur CCR2 qui interagit avec CCL2 serait capable de potentialiser la migration des thymocytes en réponse à la S1P (Aili et al., 2018).

C.3.3.2.2 S1P et survie des lymphocytes T naïfs

Très récemment, il a été mis en évidence chez la souris que le récepteur S1P1 exprimé par les lymphocytes T naïfs leur permettait de se protéger de l'apoptose lors du passage dans les vaisseaux lymphatiques après la sortie des ganglions s'ils n'avaient pas été activés par un antigène spécifique (Mendoza et al., 2017). La S1P pourrait participer ainsi à l'homéostasie lymphocytaire indépendamment de l'IL-7. Il semble que ce soit seulement les lymphocytes T naïfs qui puissent suivre le gradient de S1P avec S1P1. Les populations T effectrices circulantes expriment moins S1P1 que les T naïfs et ont une migration inhibée par la S1P qui va activer S1P2 dans ce contexte de baisse d'expression de S1P1 (Drouillard et al., 2018). (Figure 18)

C.3.3.2.3 S1PR et activation des lymphocytes T

En s'activant, un lymphocyte T naïf qui rencontre un antigène va exprimer la molécule CD69, ce qui va contrer la signalisation *via* S1P1 (Siow LR, Nature 2006). De plus, la molécule CD69 peut interagir directement avec S1P1 pour faciliter son internalisation (Bankovich et al., 2010). Le lymphocyte T est ainsi retenu dans le ganglion permettant l'expansion clonale des lymphocytes. Suite à de multiples divisions cellulaires, l'expression de CCR7 est diminuée et la signalisation *via* S1P1 peut reprendre le relais et permettre la sortie du ganglion *via* les vaisseaux lymphatiques pour rejoindre la circulation sanguine en suivant le gradient de S1P (Pham et al., 2008 ; Benechet et al., 2016) (Figure 19). De plus, il a été montré que la stimulation concomitante du TCR et des S1PR inhibait la prolifération lymphocytaire T (Jin et al., 2003), l'inhibition de la prolifération serait liée à la stimulation de S1P4 (Wang et al., 2005).

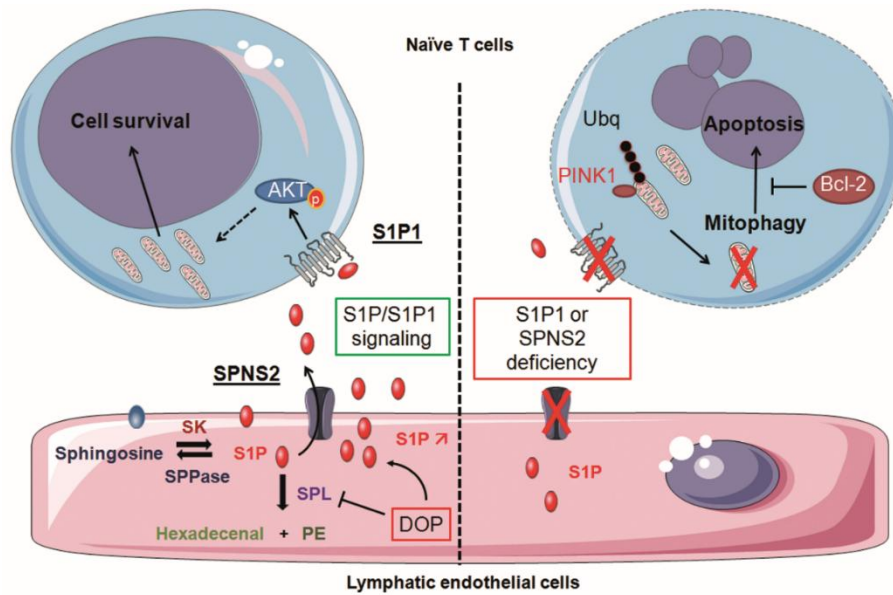


Figure 18

La S1P produite par les cellules endothéliales lymphatiques (LEC) et sécrétée par SPNS2 favorise la survie des lymphocytes T naïfs.

La S1P qui est sécrétée à l'extérieur des LEC grâce à son transporteur spécifique SPNS2. La S1P peut être déphosphorylée par les S1P phosphatases 1/2 (SPPase) ou dégradée par la SPL. L'inhibition de la SPL par la deoxyripyridoxine (DOP) augmente les niveaux de S1P dans les ganglions. La S1P se lie à S1P1 sur les LyT naïfs et active la voie de signalisation AKT qui favorise la survie des Ly T naïfs. La délétion de SPNS2 ou de S1P1 entraîne une accumulation de la protéine PINK1 dans les mitochondries, favorisant ainsi l'ubiquitinylation des protéines mitochondriales, et de la mitophagie. La surexpression de Bcl-2 contre l'apoptose induite par la perte du signal S1P/S1P1. S1P: sphingosine-1-phosphate; S1P1: S1P récepteur 1. Ubq, Ubiquitine; Bcl-2: B cell lymphoma-2; PINK1: PTEN-induced putative kinase 1 (D'après Peres et al., 2018).

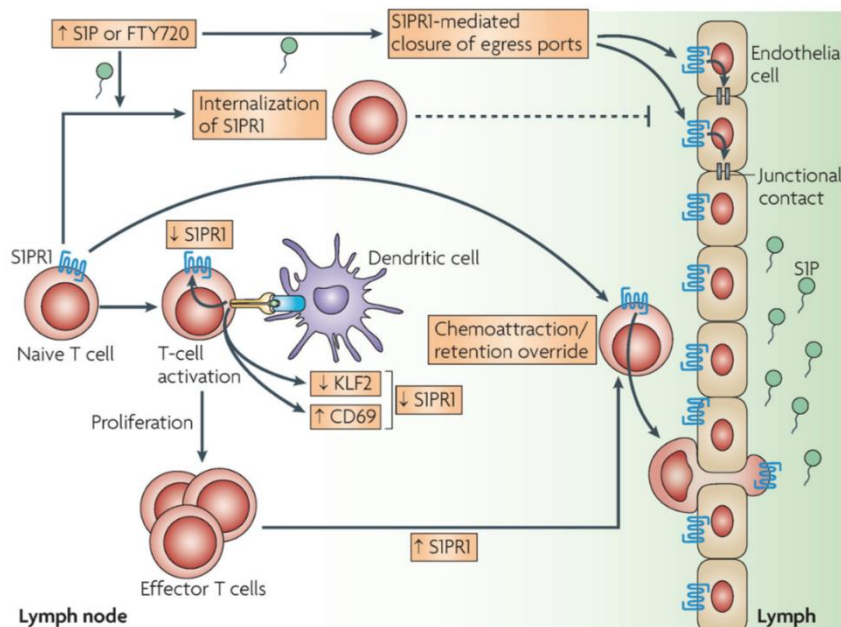


Figure 19

Rôle de S1P1, KLF2 et CD69 dans l'activation et la circulation des ly T dans les ganglions.

Les lymphocytes T naïfs expriment S1P1. Une perturbation du gradient de S1P ou de l'expression de S1P1 par le FTY720 perturbe la sortie des Ly T du ganglion. Après activation d'un lymphocytes T naïf, l'expression de CD69 à la surface des lymphocytes augmente et celle de KLF2 et de S1P1 est diminuée. L'expression de S1P1 est augmentée après l'activation pour sortir du ganglion (D'après Rivera et al., 2008).

C.3.3.2.4 S1PR et polarisation lymphocytaire T

Les S1PR ont aussi un rôle dans la polarisation des T CD4 lors de leur activation ou du maintien de leurs fonctions. La S1P serait capable de retenir les lymphocytes T CD4 en interagissant avec les récepteurs à la S1P dans les tissus inflammatoires (Jaigirdar et al., 2017).

La délétion de S1P1 dans les lymphocytes T entraîne un défaut de polarisation *in vitro* en Th17. Dans un modèle de SEP chez la souris (« Experimental Autoimmune Encephalomyelitis » : EAE) ayant un défaut d'internalisation de S1P1, la polarisation des Ly T en Th17 est augmentée, ce qui induit une EAE plus sévère et une infiltration lymphocytaire dans le SNC plus importante (Garris et al., 2013) La délétion du récepteur S1P1 sous le contrôle du promoteur de l'IL-17 réduit les signes de l'EAE (Eken et al., 2017). La S1P pourrait être produite par les Th17 eux même grâce à la SK1 (Barra et al., 2018). Les souris S1P4^{-/-} ont une différenciation Th17 moins importante mais ceci serait plus lié à un changement des fonctions des DC (Schulze et al., 2011). Le récepteur S1P3 est impliqué dans la migration des Th17 en réponse à CD95L (Poissonnier et al., 2016).

La signalisation *via* S1P1 inhibe la polarisation en Treg en activant la voie de signalisation de la kinase mTOR, ce qui inhibe l'effet du TGF- β (Liu et al., 2009 ; Liu et al., 2010). Chez les patients traités par FTY720, il y'a une augmentation du nombre de Treg en parallèle d'une diminution des T mémoires centraux (Serpero et al., 2013). De même, la délétion du récepteur S1P1 uniquement dans les Treg entraîne des manifestations auto-immunes multiples et un défaut de régulation du système immunitaire (Eken et al., 2017).

Le rôle de S1P1 dans la migration des Treg dans un contexte tumoral reste controversé. Dans un modèle murin de cancer du sein, le récepteur S1P1, qui active STAT3 en aval, est utilisé par les Treg pour migrer dans la tumeur. Il n'a pas été possible de prouver que la migration se faisait en réponse à la S1P ou à un autre composé (Priceman et al., 2014). Dans une étude, les Treg de ganglions lymphatiques atteints par un lymphome folliculaire migrent moins en réponse à la S1P que des Treg issus d'un ganglion sain (Nedelkovska et al., 2016). Pourtant une autre étude montrait que la stimulation du TCR des Treg, issus de la moelle osseuse de patientes atteints d'un cancer du sein et spécifiques d'un antigène tumoral, induisait l'expression du récepteur S1P1 à leur surface et leur migration en réponse à la S1P (Rathinasamy et al., 2017).

C.3.3.3 S1PR et lymphocytes T résidents mémoires

Dans une sous-population de Ly T CD8⁺ mémoires résident des tissus non-lymphoïdes (T_{RM}), la diminution de l'expression du facteur de transcription KLF2 entraîne une diminution de l'expression de sa cible, S1P1. Les T_{RM} deviennent ainsi insensible à la S1P circulante et sont maintenus dans les tissus (Skon et al., 2013). Il semble que l'expression initiale de CD69 par les T CD8⁺ soit un facteur crucial pour leur permettre de rester et de se différencier en T_{RM} dans les tissus comme la peau (Mackay et al., 2015).

OBJECTIF DE LA THESE

Il existe une hétérogénéité entre les différents cancers du sein. Le métabolisme des sphingolipides est altéré dans les cancers du sein mais il n'existe pas à l'heure actuelle de données qui permettent de savoir précisément quels sphingolipides sont enrichis dans les différents sous-types de cancers du sein et quel est l'impact de ces altérations sphingolipidiques sur la réponse immunitaire et le développement tumoral.

Dans ce contexte, l'objectif de mes travaux de thèse est double.

Le premier objectif a été de caractériser une signature sphingolipidique de tumeurs mammaires humaines pour savoir quels sphingolipides sont produits en quantité anormale dans les tumeurs en fonction du sous-type histologique. Cette partie nous a permis d'identifier une signature sphingolipidique enrichie dans le cancer du sein triple négatif.

Etant donné que les sphingolipides sont impliqués dans la migration, l'activation et la différenciation des cellules immunitaires, le deuxième objectif de ma thèse a été d'établir une signature sphingolipidique associée à un type de réponse immunitaire dans le cancer du sein. Cette partie nous a permis de montrer des corrélations entre le taux intratumoral de certains sphingolipides avec le type d'infiltration tumorale par des sous-populations lymphocytaires.

Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons choisi une approche de recherche translationnelle à partir d'échantillons tumoraux humains collectés de manière prospective avant induction de la thérapie.

MATERIEL ET METHODES

A. Echantillons biologiques

Les échantillons de sang périphérique et les concentrés leucocytaires (« Buffy-coat ») de donneuses saines ont été obtenus auprès de l'établissement français du sang (EFS-Pyrénées-méditerranée). L'étude clinique a été approuvée par le centre de ressources biologiques en cancérologie (CRB-Cancer). Les échantillons de tumeurs mammaires ont été collectés auprès du laboratoire d'anatomopathologie de l'institut Claudius Régaud (ICR) puis de l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-OncoPole (IUCT-O). Les patientes ont donné leur consentement éclairé et les données cliniques ont été anonymisées, conformément aux recommandations du CRB-Cancer.

B. Lipidomique et spectrométrie de masse

Un échantillon de tumeur non dissocié a été gardé et congelé à -80°C. Après décongélation, les tumeurs ont été découpées et placées dans des tubes contenant des billes en céramique de 1,4 mm (Lysing Beads Matrix D, MP biomédical). La lyse a été réalisée grâce à un Precellys (Bertin instruments). Le surnageant a été centrifugé puis aliquoté pour réaliser un dosage protéique avec la technique de Bradford. L'extrait tumoral a été congelé à -80°C avant l'analyse. Les taux de lipides intratumoraux ont été déterminés par spectrométrie de masse (UPLC-TOF).

C. BCgenExMiner

Les analyses d'expression géniques entre les groupes de cancers du sein des enzymes ont été réalisées avec bc-GenExMiner v4.1 (<http://bcgenex.centregauducheau.fr>) (Jezequel et al., 2012).

D. Isolement des leucocytes du sang périphérique (PBMC)

Le sang périphérique anticoagulé de donneuses saines a été dilué au demi dans du RPMI puis déposé délicatement dans un tube au-dessus d'un tiers de volume de Ficoll hypaque (General Electrics Healthcare). Les tubes ont été centrifugés 20 min à 2000 rpm. L'anneau de PBMC a été aspiré puis transféré dans un autre tube et lavé 3 fois en RPMI.

E. Digestion mécanique des échantillons tumoraux

Nous avons utilisé un protocole publié pour l'analyse des TIL dans des échantillons humains (Garaud et al., 2014). Les échantillons de tumeurs fraîchement recueillies dans du RPMI, ont été découpés en petits morceaux de 2-4 mm, puis mis dans un tube GentleMACS C (Miltenyi biotec) contenant 3 mL de RPMI. Le tube a été mis sur le GentleMACS dissociator avec le programme A01 à 2 reprises. La suspension cellulaire a été récupérée et passée sur un filtre de 40µm puis lavé avec 3 ml de RPMI. Le reste de la tumeur a été remis dans le tube C avec 3 ml de RPMI dissocié avec le programme A01 à 2 reprises. La suspension cellulaire a été passée sur un filtre de 40 µm et lavé avec 3 mL de RPMI. La suspension cellulaire a été centrifugée 10 min à et le culot repris en PBS-EDTA avant d'être utilisé pour le marquage en cytométrie.

F. Immunohistochimie

Les échantillons de tumeurs inclus en paraffine ont été coupés au microtome et déposés et fixés sur une lame de verre. Le marquage CD8 (clone SP57, Roche Ventana) a été réalisé à partir d'un protocole validé par le laboratoire d'anatomopathologie de l'IUCT-O sur un BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems). La révélation du marquage a été faite avec des anticorps secondaires couplés à l'HRP et avec le substrat DAB (Optiview DAB IHC Detection Kit, Ventana Medical Systems). Une contre coloration par H&E a été effectuée puis les échantillons ont été déshydratés par traitement à l'alcool et des lamelles ont été placées sur les échantillons.

G. Cytométrie en flux

La réalisation des marquages des PBMC, des lignées cellulaires ou des cellules isolées de tumeurs ont été faites dans les conditions suivantes. Les cellules ont été incubées avec le marqueur de viabilité Live/Dead aqua (Invitrogen) et les Ac pour le marquage membranaire 20 min à 20°C avec les cellules dans une plaque 96 puits. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois dans du PBS. Pour les marquages membranaires seuls, les cellules ont ensuite été remises en suspension et analysées au cytomètre. Pour les expériences où un marquage intracellulaire a été effectué, le kit FoxP3 Fixation/Permeabilization (ebioscience) a été utilisé. Le tampon Fix/Perm a été reconstitué extemporanément selon les recommandations du fournisseur, le tampon de perméabilisation a été dilué au 1/10^{ème} avec de l'eau milliQ. Les cellules ont d'abord été fixées avec le tampon Fix/Perm pendant 30 min. Deux lavages avec

du tampon de perméabilisation ont été réalisés avant d'ajouter les Ac pour le marquage intracellulaire. Après 30 min d'incubation à température ambiante, les cellules ont été lavées 2 fois en tampon de perméabilisation puis reprises dans du PBS avant d'être analysées. Les panels d'Ac utilisés sont listés en Annexe 2.

Les expériences de cytométrie en flux ont été réalisées sur un cytomètre BD LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences). Les réglages de voltages des photomultiplicateurs (PMT) et des compensations ont été réalisés avec des cellules non marquées, des cellules monomarquées, et/ou des billes de capture d'Ac (ebioscience).

H. Tri et stimulation des lymphocytes T

Les cellules ont été reprises en PBS EDTA 0,5%SVF avant d'être triées. Nous avons utilisé un kit de sélection négative (Miltenyi biotec). Brièvement, la suspension cellulaire a été mise au contact des anticorps déplétant pendant 5 min au réfrigérateur. Les billes magnétiques ont été ajoutées pendant 10 minutes supplémentaires et la suspension a été filtrée sur une colonne LS (Miltenyi biotec) devant un aimant. L'éluat a été compté, puis lavé dans du milieu TEXMACS (Miltenyi biotec).

Les lymphocytes T ont été congelés en culot sec à J0 ou bien stimulés avec un streptamère anti-CD3/CD28 (Stemcell technologies), un culot sec a été congelé avec les lymphocytes T stimulés à J1, J2 et J6.

I. PCR quantitative en temps réel

L'ARN des lymphocytes T stimulés ou non a été réalisé avec le kit RNeasy plus (QIAGEN) selon les recommandations du fournisseur. 1µg d'ARN a été utilisé pour réaliser la transcriptase inverse. Les ADNc obtenus ont été repris dans de l'eau milliQ et mélangé avec les sondes correspondantes et le SYBR Premix Ex Taq II (Takara) en plaques 96 puits. Le gène de la *GAPDH* a été utilisé pour normaliser les résultats.

J. Analyse statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel R ou le logiciel GraphPad Prism. Les tests réalisés ont été selon les cas, un test de Mann-Whitney non apparié, corrigé ou non par la méthode de Bonferroni, un test de Kruskal-Wallis, un test de Wilcoxon ou des corrélations de Spearman. Le test de Welch a été fait directement sur le site de la base bc-GenExMiner.

RESULTATS

A. Signature sphingolipidique des cancers du sein

A.1 Taux de sphingolipides totaux dans les cancers du sein

Nous avons d'abord analysé la composition en sphingolipides totaux dans 10 échantillons de tissu mammaire sain prélevés à distance de la tumeur lors d'une mastectomie avec les 54 échantillons tumoraux collectés. Les dosages de sphingolipides réalisés par spectrométrie de masse ont été normalisés par rapport au dosage des protéines totales réalisées sur le même extrait. Nous avons pu observer que le taux de sphingolipides est augmenté dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains pour tous les sphingolipides dosés à l'exception du dihydrocéramide (**Figure 20**).

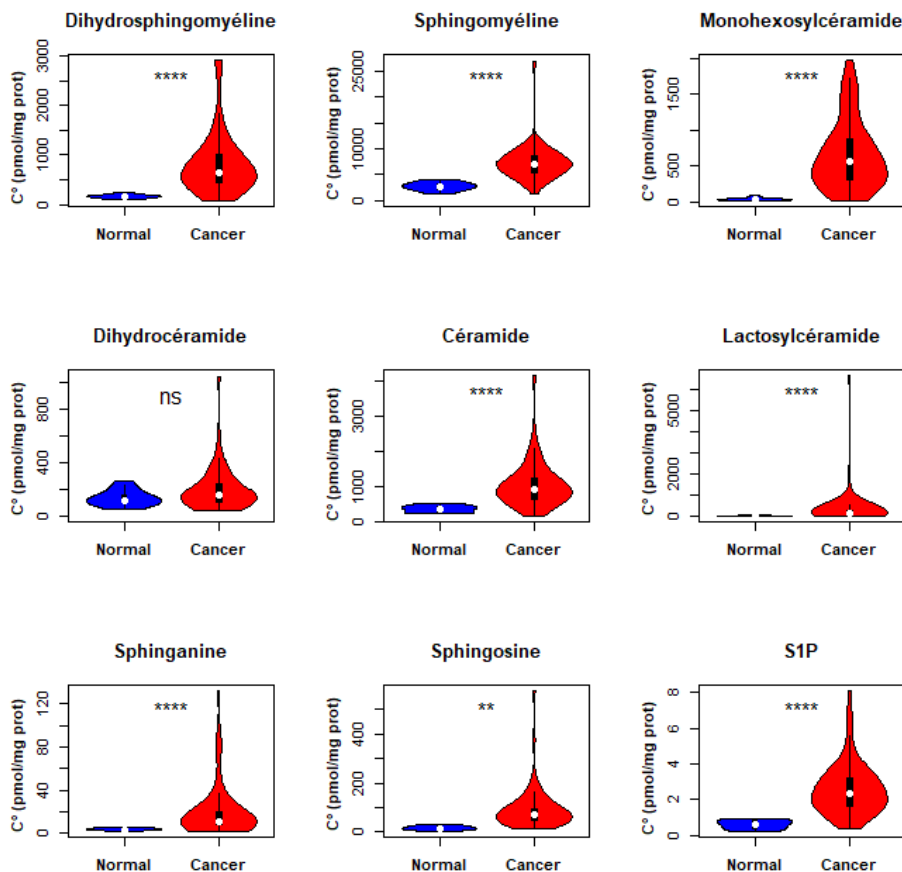


Figure 20

Comparaison du dosage de 9 sphingolipides totaux normalisé par rapport au dosage de protéines. Violin-plot réalisé avec les échantillons de tissus sain en bleu et les échantillons tumoraux en rouge. Un test de Mann-Whitney a été réalisé pour comparer les dosages entre tissus sain et tumoral pour chaque sphingolipide. p-value : * < 0,05 ; ** < 0,01 ; *** < 0,001 ; **** < 0,0001.

A.2 Taux de sphingolipides totaux en fonction des différents types de cancers du sein

Nous avons voulu regarder ensuite s'il existait un taux différent de sphingolipides en fonction des sous-types de cancer du sein. Nous avons séparé les tumeurs en 3 groupes selon l'expression de marqueurs en immunohistochimie. Le premier groupe (RH+HER2-) comporte 24 tumeurs, le deuxième 14 tumeurs (HER2+) dont 9 RH+HER2+ et 5 RH-HER2+ et enfin le troisième groupe (TNBC) qui compte 13 échantillons de tumeurs. Nous avons retiré 3 tumeurs de l'analyse qui avaient un statut HER2 équivoque. Il est à noter que le faible nombre d'échantillons RH-HER2+ ne nous a pas permis de faire une analyse statistique en individualisant ce sous-type histologique. Nous n'avons pas observé de différence significative entre les dosages de sphingolipides sauf pour les monohéxosylcéramides qui sont plus élevés dans le groupe TNBC que le groupe HER2+ et pour la S1P qui est plus élevée dans le groupe RH+ HER2- par rapport au groupe HER2+ (**Figure 21**).

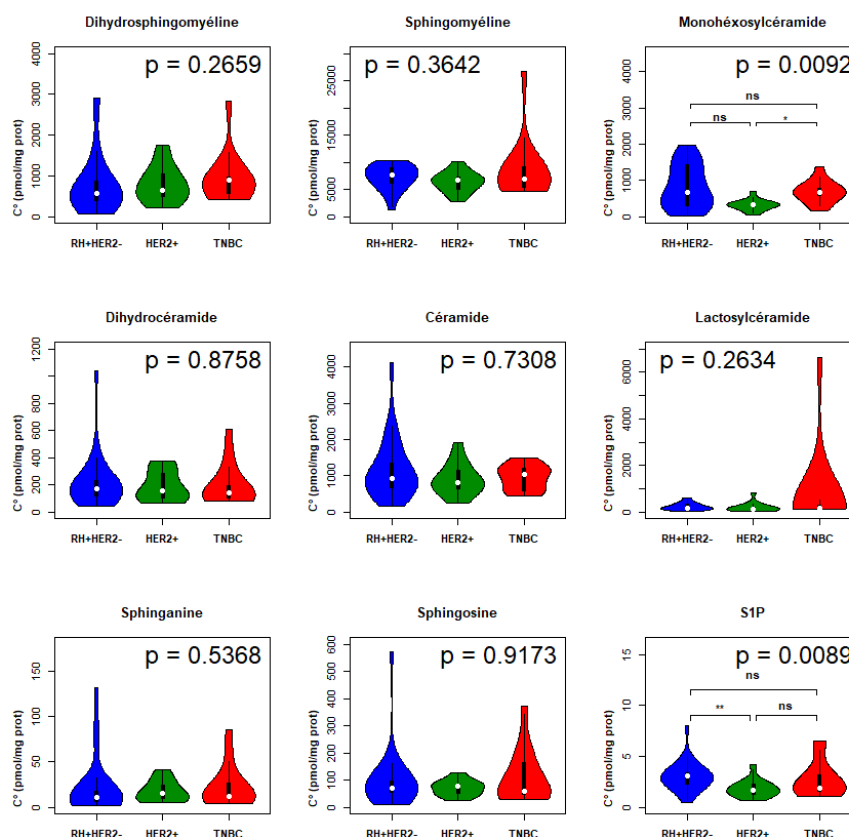


Figure 21

Comparaison des dosages de sphingolipides pour 3 dans les différents types de cancers du sein. Le groupe de tumeurs RH+ HER2- (n=24) est représenté en bleu, le groupe HER2+ (n=14) en vert et le groupe TNBC (n=13) en rouge. Un test de Kruskal-Wallis a été réalisé pour comparer les 3 groupes entre eux pour chaque sphingolipide. Un test de Mann-Whitney corrigé par la méthode de Bonferroni a été réalisé pour comparer les dosages entre les différents groupes de tumeurs pour les monohéxosylcéramides et la S1P. p-value : *<0,05 ; **<0,01 ; ***<0,001 ; ****<0,0001.

A.3 Identification d'une signature sphingolipidique des TNBC

A.3.1 Corrélation entre les dosages de sphingolipides des tumeurs

Les résultats précédents indiquent qu'il n'existe pas de différences majeures entre les 3 groupes de cancers pour les dosages de SL totaux. Dans le but de mettre en évidence d'éventuelles voies métaboliques distinctes du céramide dans les 3 groupes de cancer, nous avons évalué s'il existait des corrélations entre les taux de certains sphingolipides.

Dans les cancers **RH+HER2-**, nous avons observé une forte corrélation entre les taux de céramide et de monohexosylcéramide. Les taux de sphingosine et de S1P sont aussi corrélés. On note également une très bonne corrélation entre les taux de sphingosine et de céramide. Dans le groupe **HER2+**, les taux de sphingomyéline et de lactosylcéramide sont fortement corrélés alors que le céramide et les monohexosylcéramides ne le sont pas. Dans les **TNBC**, la sphingomyéline est fortement corrélée avec le céramide, la sphingosine et la S1P. A l'opposé, le céramide n'est pas corrélé au monohexosylcéramide.

Ainsi, ces résultats suggèrent l'existence d'une signature sphingolipidique différente dans les tumeurs non TNBC et TNBC. Ces différences pourraient s'expliquer par la métabolisation du céramide nouvellement synthétisé vers la voie des glycosphingolipides et de la sphingomyéline respectivement dans les tumeurs non TNBC et dans les TNBC. Alternativement, un catabolisme accru de glycosphingolipides en céramide et de sphingomyéline en céramide respectivement dans les non TNBC et les TNBC pourrait contribuer à nos observations.

A.3.2 Altérations des proportions de sphingolipides en -C16 :0 et -C24 :0 dans les cancers TNBC

Nous avons ensuite analysé la répartition des chaînes acylées dans les SL complexes dans les différents groupes de tumeurs. Tous les SL en -C24:0 sont en proportion plus importante dans les TNBC que les tumeurs RH+ HER2-. A l'exception du LacCer et de la dhSM, tous les SL -C16:0 sont en plus grand proportion dans les RH+HER2- que les TNBC. Les TNBC ont moins de C16:0-Cer, C16:0-SM, C16:0-dhCer et de C16:0-dhSM, et plus de C24:0-Cer, C24:0-dhCer et de C24:0-dhSM que les tumeurs HER2+. Les HER2+ ont plus de C24:0-HexCer que les RH+HER2 (Tableau 2). Les tableaux complets des comparaisons de toutes les espèces de SL sont regroupés en Annexe 3.

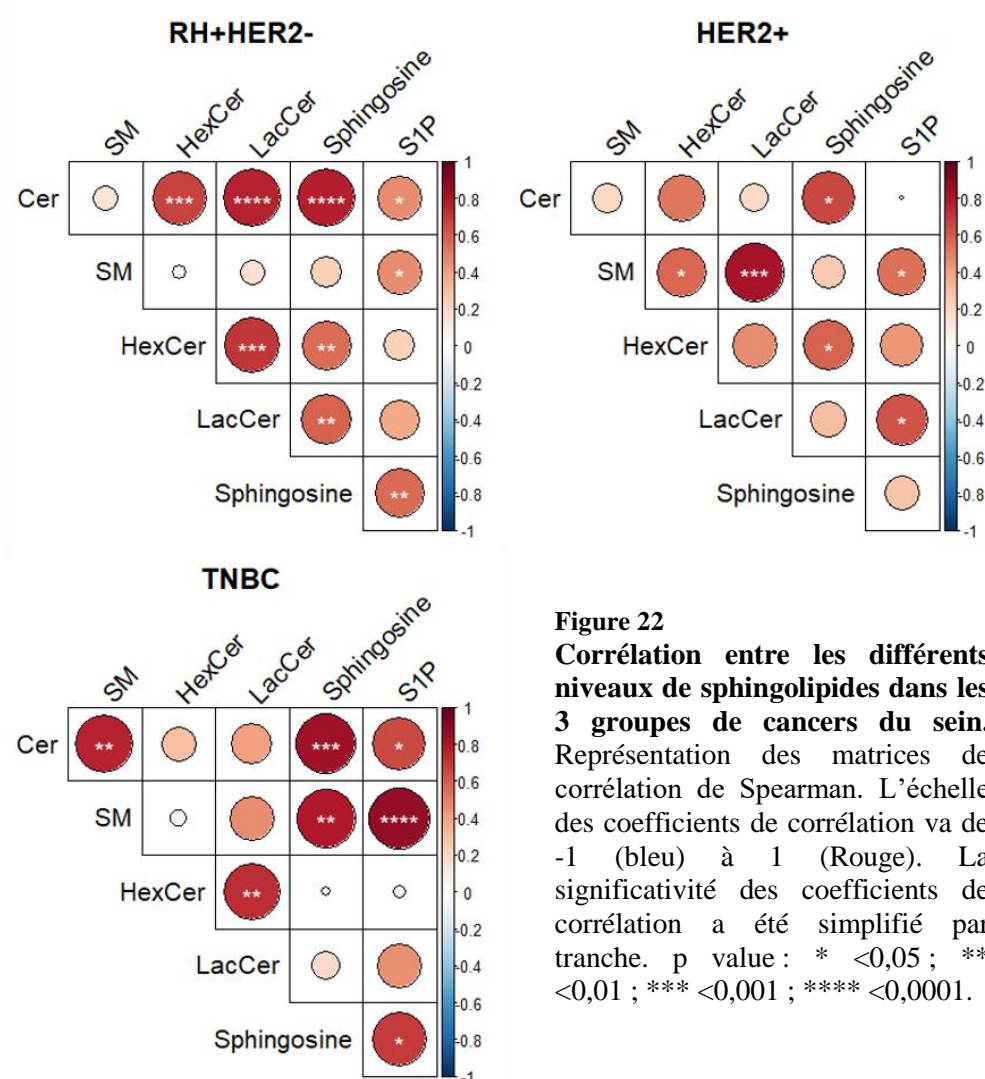


Figure 22
Corrélation entre les différents niveaux de sphingolipides dans les 3 groupes de cancers du sein.
 Représentation des matrices de corrélation de Spearman. L'échelle des coefficients de corrélation va de -1 (bleu) à 1 (Rouge). La significativité des coefficients de corrélation a été simplifiée par tranche. p value : * <0,05 ; ** <0,01 ; *** <0,001 ; **** <0,0001.

En comparant les TNBC avec les tumeurs non TNBC, il apparaît que les SL en -C24:0 sont bien plus représentés, et que les SL en -C16:0 sont moins importants dans les TNBC par rapport aux autres tumeurs. Ces 2 dernières espèces sont parmi les plus représentées avec les SL en -C22:0 et en -C24:1 dans les tissus sains et cancéreux. Un déséquilibre pourrait impacter plusieurs fonctions biologiques et expliquer certaines caractéristiques clinicobiologiques entre les tumeurs TNBC et non TNBC.

A.3.3 Les sphingolipides en -C24:0 comme biomarqueur des TNBC

Les résultats précédents suggèrent que les SL en -C16:0 ou en -C24:0 pourraient être utilisés comme biomarqueurs des TNBC. Nous avons regardé quelle était la quantité de molécules de SL en -C16:0 ou en -C24:0 dans les TNBC et les autres types de cancers.

Une différence légère est observée pour le dosage de certains sphingolipides en -C16:0 qui semblent plus importants dans le groupe non TNBC. Toutefois, cette différence est significative seulement pour le dosage du C16:0-dhCer (Figure 23), suggérant que des altérations du métabolisme des SLs ont lieu dès les toutes premières étapes de la synthèse *de novo* des SL dans les TNBC.

Tableau 2
Proportion relative des différentes espèces de sphingolipides en -C16:0 et en -C24:0

		Médiane du pourcentage (Min-Max)			p value*			p value**
Lipide	Espèce	RH+ HER2- (n=24)	HER2+ (n=14)	TNBC (n=13)	TNBC vs RH+ HER2-	TNBC vs HER2+	HER2+ vs RH+ HER2-	TNBC vs non TNBC
Cer	C16:0	23.51 (5.32- 39.75)	21.95 (11.62- 35.55)	15.56 (10.6- 24.18)	0.002	0.0168	1	0.0006
	C24:0	11.34 (5.7- 19.65)	14.36 (4.77- 23.33)	20.71 (8.64- 37.69)	0.0004	0.058	0.512	0.0004
SM	C16:0	38.76 (20.72- 47.93)	32.68 (26.39- 48.45)	28.74 (20.76- 41.91)	0.0034	0.0168	0.3387	0.0008
	C24:0	12.3 (8.57- 21.38)	15.66 (10.7- 23.1)	17.92 (11.72- 26.92)	0.0246	1	0.1737	0.0296
Hex Cer	C16:0	19.8 (3.19- 48.95)	17.54 (5.94- 29.61)	12.08 (5.96- 22.11)	0.02	0.1628	0.9893	0.0073
	C24:0	17.65 (7.47- 45.51)	28.53 (14.19- 39.41)	35.39 (18.43- 67.77)	0.0007	0.2288	0.0443	0.0014
Lac Cer	C16:0	5.01 (1.3- 9.4)	5.74 (2.29- 7.65)	4.03 (2.42- 6.74)	0.6718	0.3143	1	0.0078
	C24:0	19.31 (10.69- 43.45)	24.49 (13.54- 42.77)	31.17 (12.41- 55.55)	0.0405	0.5556	0.4312	0.0267
dh Cer	C16:0	48.49 (22.66- 56.19)	43.8 (32.01- 54.53)	29.04 (13.45- 50.83)	0.001	0.0016	1	0.0001
	C24:0	19.82 (8.94- 46.71)	23.34 (13.75- 44.98)	39.64 (15.76- 59.05)	0.002	0.0141	1	0.0004
dh SM	C16:0	55.32 (21.49- 76.51)	60.43 (46.53- 76.41)	49.91 (42.74- 59.36)	0.2007	0.0025	0.2144	0.0065
	C24:0	5.43 (0.97- 30.2)	5.89 (3.07- 16.47)	14.44 (5.47- 23.1)	0.0008	0.0038	1	0.0001

* Test de Mann-Whitney ajusté par la méthode de bonferroni ; ** Test de Mann-Whitney

En revanche, le taux des sphingolipides en -C24:0 est significativement plus élevé dans les TNBC que les tumeurs non TNBC pour tous les SL complexes dosés. La différence la plus marquée se retrouve pour la C24:0-dhSM (Figure 24). Il semble donc que dans les tumeurs TNBC, les différences de proportion des chaînes acylés des SL soient plutôt liées à une augmentation de la synthèse des SL en -C24:0.

Nous avons également pu noter que les tumeurs de grade III d'Ellis-Elston avaient un taux de C24:0-Cer plus élevé que les tumeurs plus bas grade (I et II). Ces résultats étaient encore significatifs en éliminant les cancers TNBC qui étaient majoritairement de grade III.

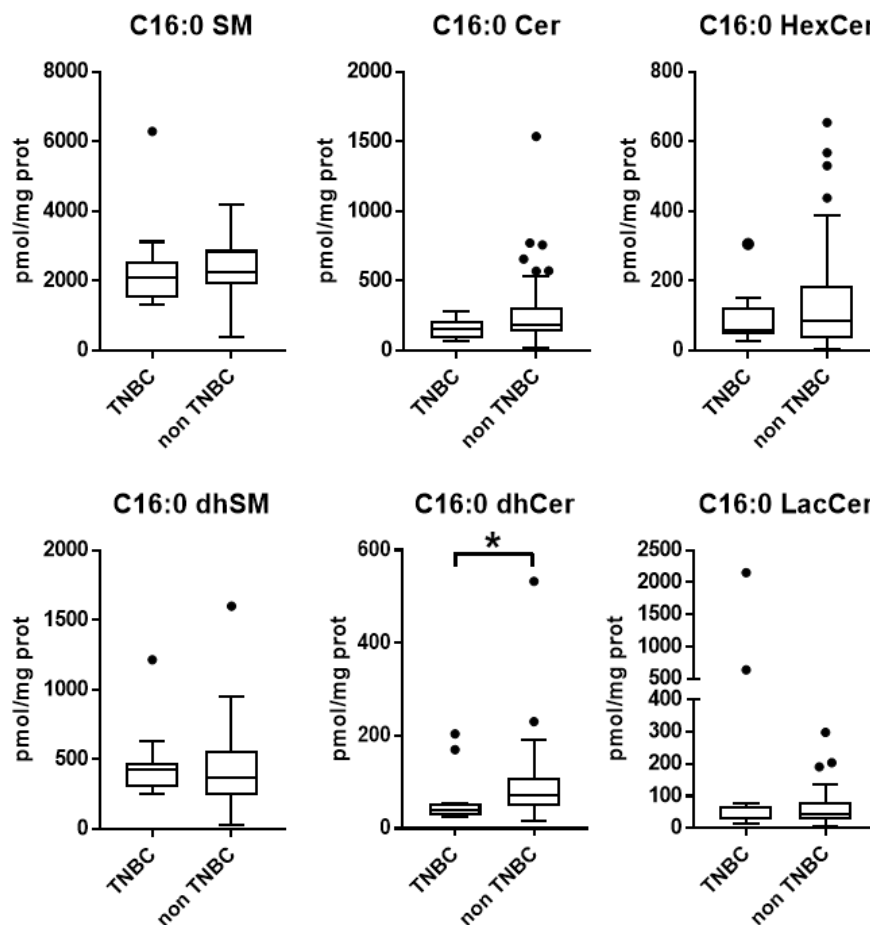


Figure 23

Comparaison des dosages de sphingolipides en -C16:0 dans les TNBC et les tumeurs non TNBC. Graphique représentant la concentration en pmol/mg de protéines des sphingolipides SM, Cer, dhSM, HexCer, LacCer en -C16:0 dans les tumeurs TNBC et non TNBC. Un test de Mann-Whitney a été réalisé pour comparer les dosages entre TNBC et non TNBC pour chaque sphingolipide. p-value : *<0,05 ; **<0,01 ; ***<0,001 ;****<0,0001.

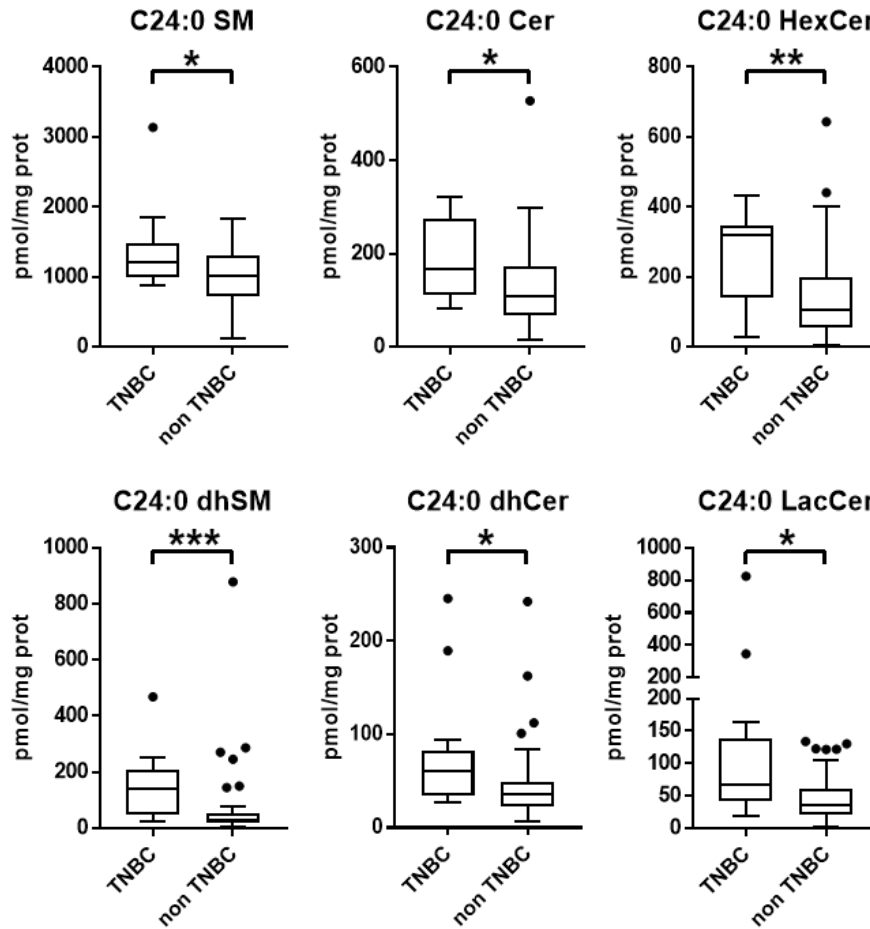


Figure 24

Comparaison des dosages de sphingolipides en -C24:0 dans les TNBC et les tumeurs non TNBC. Graphique représentant la concentration en pmol/mg de protéines des sphingolipides SM, Cer, dhSM, HexCer, LacCer en -C24:0 dans les tumeurs TNBC et non TNBC. Un test de Mann-Whitney a été réalisé pour comparer les dosages entre TNBC et non TNBC pour chaque sphingolipide. p-value : * $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,001$; **** $<0,0001$.

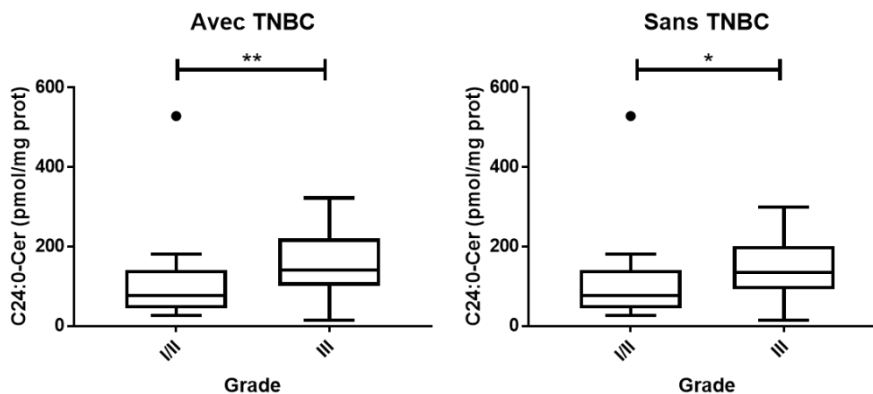


Figure 25

Taux de C24:0-céramide en fonction du grade des tumeurs. Dans le panel de gauche, le taux de C24:0-Cer est représenté pour les tumeurs de faible grade d'Ellis-Elston (I et II) et les tumeurs de grade III. Dans le panel de droite, les tumeurs TNBC ont été exclues de l'analyse. Un test de Mann-Whitney a été réalisé pour comparer les dosages de C24:0-céramide entre haut grade et faible grade. . p-value : * $<0,05$; ** $<0,01$

Tandis que le dosage quantitatif des sphingolipides est réalisable uniquement par spectrométrie de masse, l'analyse de la proportion relative des espèces de SL à chaînes d'acide gras courtes (en -C16/C18) et longues ($\geq C20$) peut se faire à l'aide de techniques chromatographiques plus simples. Nous avons donc choisi de regarder le ratio C16:0/C24:0 pour chaque espèce de sphingolipide et nous avons réalisé des courbes ROC (« receiver operator Curve ») en fonction de la sensibilité et de la spécificité à discriminer les TNBC des autres tumeurs. Le ratio C16:0/C24:0 est inversé pour certains SL ou diminué pour d'autres SL dans les TNBC par rapport aux tumeurs non TNBC.

Le ratio C16:0/C24:0 semble être un biomarqueur discriminant des TNBC pour les 6 familles de sphingolipides que nous avons dosées. Le meilleur discriminant est le ratio C16:0/C24:0 dhSM avec une sensibilité de 82,9% (IC95% : 67,9-92,9%) et une spécificité de 84,6% (IC95% : 54,6-98,1%) à un seuil de 6,76. De plus, le ratio C16:0/C24:0 reste très discriminant pour la SM, le Cer et le dhCer et, dans une moindre mesure, pour les monohexosylcéramides (Figure 26).

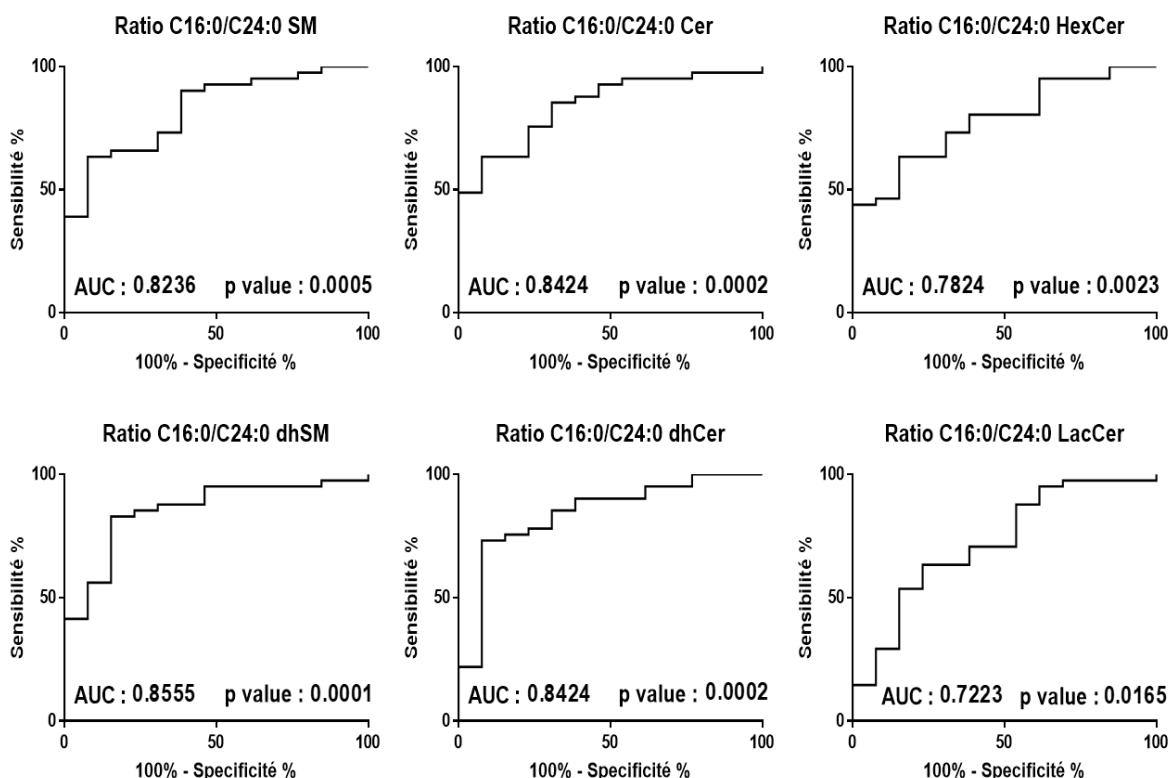


Figure 26

Le ratio C16:0/C24:0 est un biomarqueur discriminant des TNBC. Courbe ROC des ratios C16:0/C24:0 pour la SM, la dhSM, le Cer, le dhCer, les hexosylcéramide et le lactosylcéramide pour séparer les TNBC des autres types de cancers. Les aires sous la courbe (AUC) et les p value sont notées pour chaque famille de SL.

A.4 Méta-analyse : expression génique

Nos observations précédentes pourraient être liées à des modifications de l'expression de certaines enzymes du métabolisme des SL. A partir d'une base de données publique (bc-GenExMiner), nous avons analysé l'expression des gènes codant pour certaines enzymes impliquées dans la synthèse des SL.

A.4.1 Niveau d'expression des enzymes de la voie de synthèse des glycosphingolipides et de la sphingomyéline

L'expression d'*UGCG*, codant pour la glucosylcéramide synthase, qui synthétise le GlcCer, est très inférieure dans les TNBC par rapport aux autres groupes de cancers. Nous avons ensuite regardé s'il existait une modification de l'expression des enzymes intervenant dans la synthèse de la sphingomyéline. Tandis que *SGMS1*, codant pour la sphingomyéline synthase 1, est exprimée de manière comparable dans les TNBC et les non TNBC, *SGMS2*, codant pour la sphingomyéline synthase 2, est plus exprimée dans les TNBC que dans les autres types de tumeurs (Figure 27). Ces observations sont en accord avec les résultats de la Figure 22 montrant que le céramide corrèle fortement avec la sphingomyéline mais pas avec les monohexosylcéramides dans les TNBC, suggérant une orientation préférentielle du métabolisme du céramide en sphingomyéline dans ce type de cancer du sein.

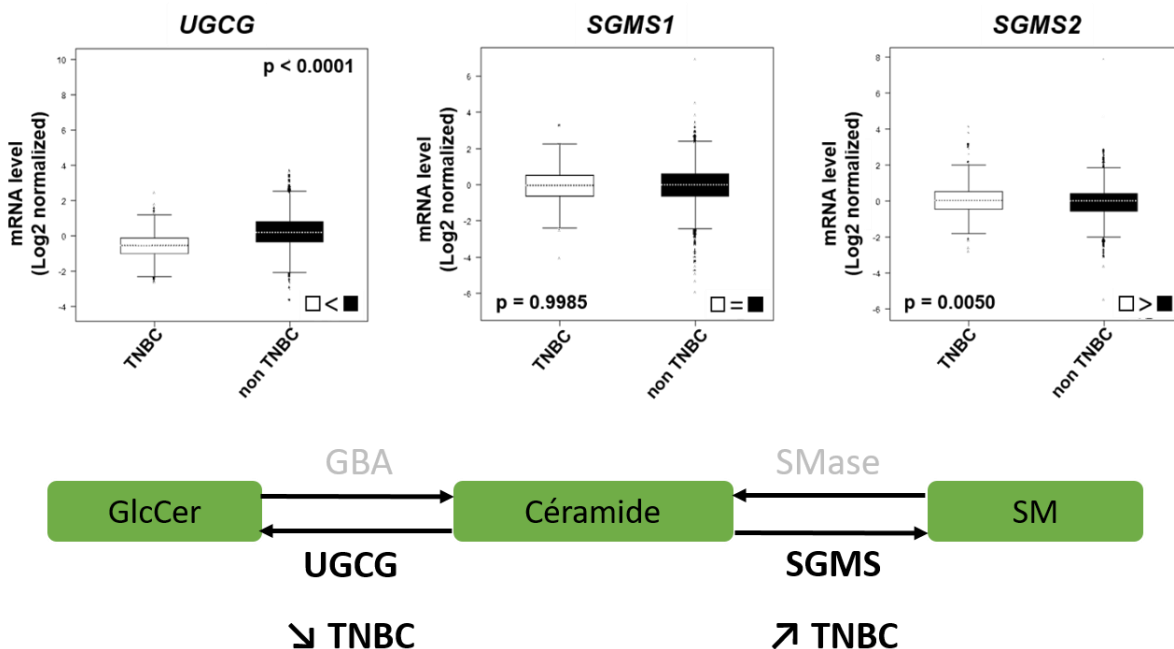


Figure 27

Expression des gènes de la synthèse du GlcCer et de la SM. Expression génique relative d'*UGCG*, et de *SGMS1-2* dans des tumeurs TNBC (blanc) et non TNBC (noir). L'expression relative est normalisée en log2 et un test de Welch a été réalisé pour comparer les 2 groupes entre eux.

A.4.2 Modifications de l'expression d'ARNm des enzymes de la famille des céramide synthases dans les TNBC

Pour comprendre pourquoi les SL en -C24:0 sont majoritaires dans les TNBC, nous avons étudié dans bc-GenExMiner l'expression des gènes codant pour les céramide synthases (CERS1-6). Ces différentes isoformes de céramide synthases synthétisent préférentiellement des SL avec une longueur définie de chaîne grasse. Par exemple, CERS3 synthétise des SL avec une chaîne grasse \geq C24:0 ; CERS1, CERS2, CERS4, CERS5 et CERS6 synthétisent respectivement et majoritairement des SL en -C18:0, en -C20:0 à -C24:0, -C18:0 à -C22:0, -C14:0, et en -C16:0. Tandis que *CERS1* et *CERS3* ont un même niveau d'expression dans les TNBC et les non TNBC, *CERS2*, *CERS4*, *CERS5* et *CERS6* sont diminuées dans les TNBC (Figure 28). Ainsi, la faible expression de CERS6 dans les TNBC pourrait contribuer au faible taux de C16:0-dihydrocéramide qui est directement généré par cette isoforme de céramide synthase (voir Figure 23). A l'opposé, le maintien de l'expression de *CERS3* dans les TNBC pourrait contribuer aux taux élevés de l'ensemble des SL en -C24:0 dans ce type de cancer (voir Figure 24).

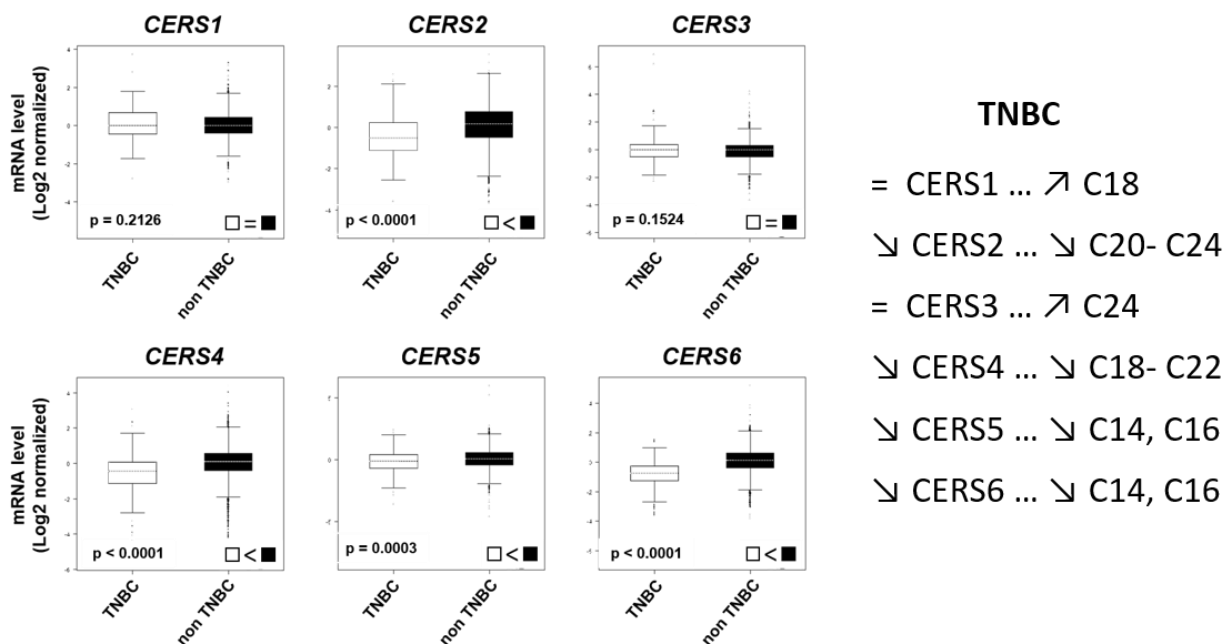


Figure 28

Expression des gènes codant pour les céramide synthases. Expression de l'ARNm de *CERS1-6* dans des tumeurs TNBC (blanc) et non TNBC (noir). L'expression relative est normalisée en log2 et un test de Welch a été réalisé pour comparer les 2 groupes entre eux.

A.4.3 Modifications de l'expression d'ARNm des enzymes de la famille des ELOVL dans les TNBC

Les acyl-CoA peuvent avoir plusieurs origines, les acyl-CoA saturés proviennent majoritairement de la synthèse endogène des acides gras. L'élongation des acides gras pour passer au-delà du C16:0 requiert l'action des élongases, codées par les gènes *ELOVL1-7*. Nous n'observons pas de différence d'expression des élongases, codées par *ELOVL2, 4* et *5*, impliquées dans la métabolisation des acides gras insaturés dans les TNBC par rapport aux non TNBC (résultats non montrés). Ceci est en accord avec le fait que nous n'observons pas de différences dans les taux de SL insaturés entre les deux groupes. Nous avons aussi analysé l'expression des élongases impliquées dans la métabolisation des acides gras saturés (*ELOVL1, 3, 6, 7*). Tandis que l'expression d'*ELOVL6* n'est pas différente entre les deux groupes de tumeurs, l'expression d'*ELOVL1, 3* et *7* est plus importante dans les TNBC (Figure 29). Ces dernières élongases étant toutes les trois impliquées dans l'élongation des Acyl-CoA saturés de -C18:0 à -C24:0, la forte expression de ces élongases pourrait contribuer, en association avec les modifications des céramide synthases, à l'augmentation des SL en -C24:0 que nous avons observée dans les TNBC.

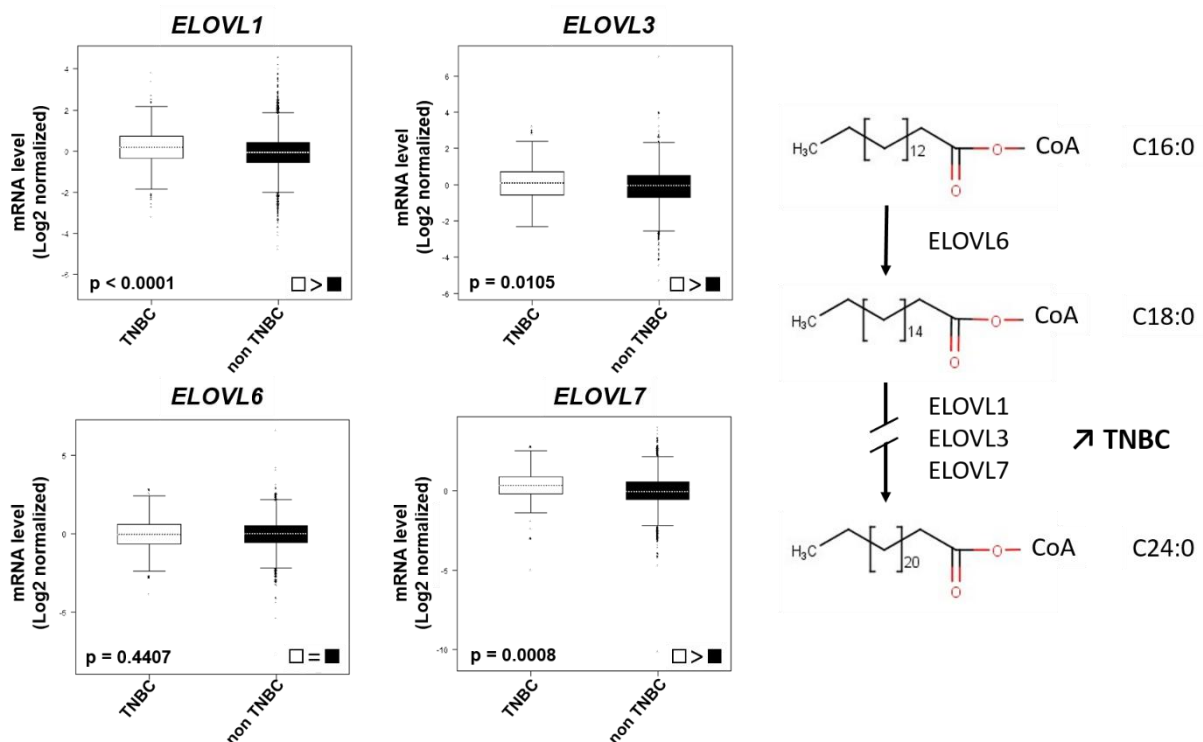


Figure 29

Expression des gènes des élongases 1, 3, 6, 7. Expression de l'ARNm d'*ELOVL1, ELOVL3, ELOVL6* et *ELOVL7* dans des tumeurs TNBC (blanc) et non TNBC (noir). L'expression relative est normalisée en log₂ et un test de Welch a été réalisé pour comparer les 2 groupes entre eux. A droite, rôle des élongases dans la synthèse des chaînes des acides gras libres.

A.5 Conclusion de la signature sphingolipidique dans les cancers du sein

Nous avons identifié plusieurs voies du métabolisme des sphingolipides qui présentent des différences entre les tumeurs de type TNBC et les autres tumeurs. La différence la plus notable est l'orientation du métabolisme des SL vers l'accumulation préférentielle de SL en -C24:0 et la baisse relative de la proportion de SL en -C16:0 dans les TNBC. Ces modifications du métabolisme sphingolipidique pourrait constituer un biomarqueur potentiel des TNBC.

En accord avec nos observations, nous avons identifié dans BC-geneExminer des modifications d'expression des gènes codant pour les céramide synthases et les élongases pouvant expliquer l'accumulation préférentielle de SL en -C24:0 dans les TNBC. Des expériences complémentaires sur des lignées cellulaires de cancer mammaire permettront dans un futur proche d'évaluer le rôle de ces différentes enzymes dans l'accumulation des SL en -C24 :0 dans les TNBC.

B. Infiltrat de lymphocytes dans le cancer du sein

La deuxième partie de ma thèse consistait à analyser l'infiltrat de lymphocytes dans les tumeurs mammaires et de faire le lien avec le métabolisme des sphingolipides. Nous avons comme hypothèse que les sphingolipides, et plus particulièrement la S1P, pouvait réguler l'infiltration des certaines sous populations de lymphocytes T dans les tumeurs. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'infiltrat des lymphocytes T dont la migration et la différenciation peuvent être influencées par des métabolites sphingolipidiques.

B.1 Stratégie d'analyse

Nous avons utilisé 2 panels d'anticorps pour analyser différentes sous populations de lymphocytes par cytométrie en flux. Le premier panel a été défini pour étudier les lymphocytes T CD8⁺ naïfs (CD45RO⁻CCR7⁺), centraux mémoires (CM) (CD45RO⁺CCR7⁺), les effecteurs mémoires (EM) (CD45RO⁺CCR7⁻), et les effecteurs mémoires RA (EMRA) (CD45RO⁻CCR7⁻) (Voir Annexe 4). Le deuxième panel nous a permis surtout d'analyser les populations de lymphocytes T CD4. Nous avons utilisé le marqueur CD45RA pour éliminer la population de lymphocyte T CD4 naïfs. Puis nous avons analysé les lymphocytes T régulateurs (CCR6⁻FoxP3⁺), les lymphocytes Th2 (CCR4⁺CXCR3⁻CCR6⁻FoxP3⁻), les lymphocytes Th1 (CXCR3⁺CCR4⁻CCR6⁻FoxP3⁻), les lymphocytes Th17 (CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁻), les Th17 régulateurs (CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁻FoxP3⁺) et enfin les Th1/17 (CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁺) (Acosta-Rodriguez et al., 2007 ; Thibaudin et al., 2016) (Voir Annexe 4).

Les pourcentages obtenus de chaque sous population ont été analysés par rapport aux lymphocytes T CD3⁺.

B.2 Infiltrat lymphocytaire par type de cancer

Nous avons regardé si la répartition des sous populations de lymphocytes était différente en fonction des groupes de tumeurs. Bien que le nombre de cellules immunitaires recueillies soit plus important pour les tumeurs de types TNBC, nous n'avons pas observé de différence significative entre les différents groupes de tumeurs pour les lymphocytes CD4⁺, CD8⁺. Les CD4⁺ sont en général un peu plus représentés que les CD8⁺, même si dans certaines tumeurs, nous observons plus de CD8⁺ que de CD4⁺ (Figure 30). Parmi les CD4⁺, les Th1 sont plus représentés dans les tumeurs RH+HER2- que dans les 2 autres groupes de tumeurs. Il n'y a pas de différence pour les Th2, les Treg, les Th17 et les Th1/17 ni pour les

Th17 FoxP3⁺ (Figure 31). Parmi les lymphocytes T CD8⁺, il y a plus de lymphocytes T CD8⁺ centraux mémoires dans les RH+HER2- que les TNBC (Figure 32). Au final, la qualité de l'infiltrat lymphocytaire T ne varie pas beaucoup entre les différents groupes de tumeurs, ce qui suggère que le type de population lymphocytaire infiltrant la tumeur n'est pas intrinsèquement lié au type de tumeur.

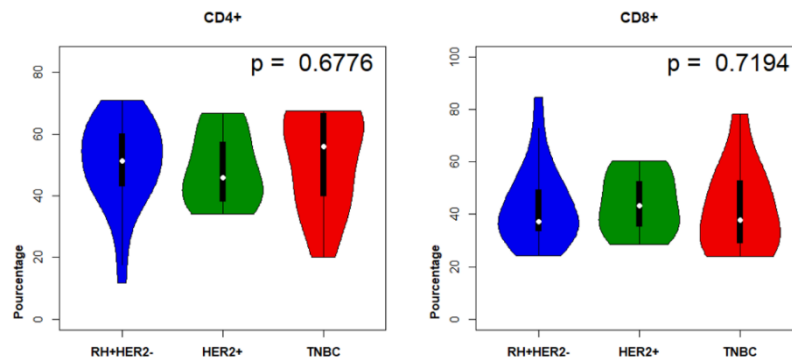


Figure 30
Pourcentage de Lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ parmi les lymphocytes T CD3⁺. Un test de Kruskal-Wallis a été réalisé pour comparer les 3 groupes de tumeurs entre eux (en haut à droite de chaque graphique).

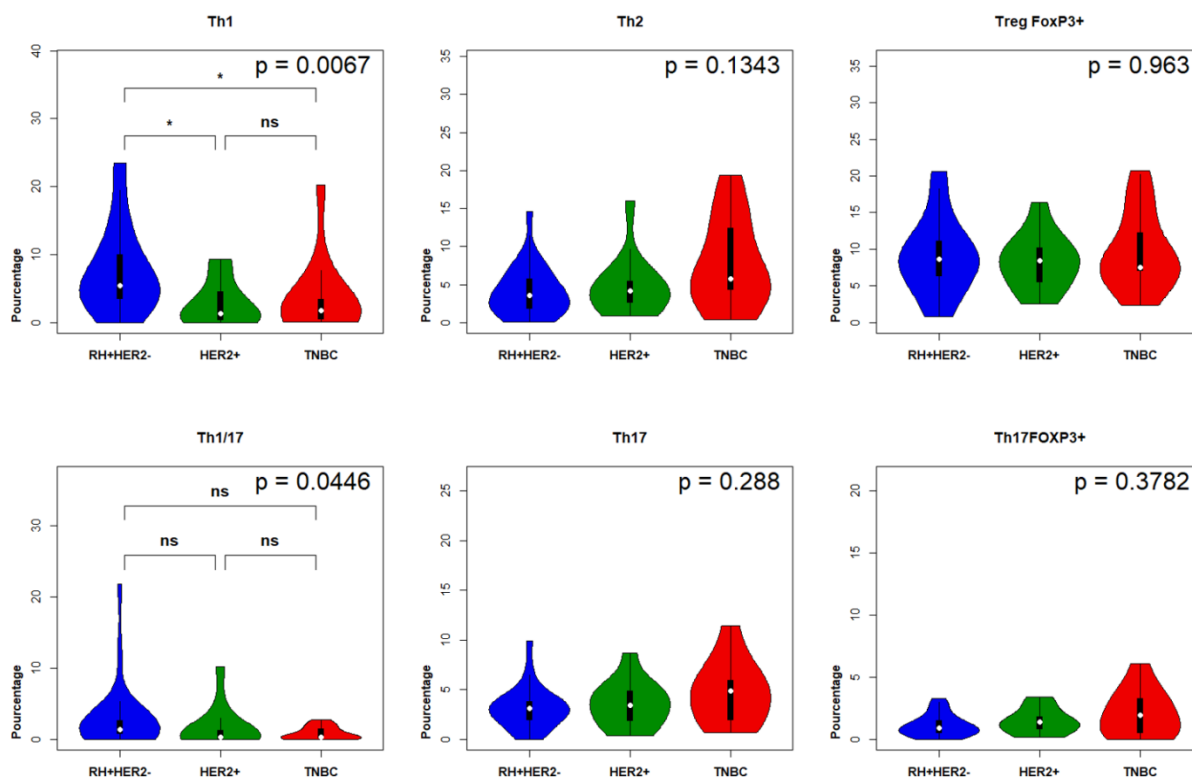


Figure 31
Pourcentage de Lymphocytes Th1, Th1/17, Th2, Th17, Treg et Th17 FoxP3⁺ parmi les lymphocytes T CD3⁺. Un test de Kruskal-Wallis a été réalisé pour comparer les 3 groupes de tumeurs entre eux (en haut à droite de chaque graphique). Un test de Mann-Whitney corrigé par la méthode de Bonferroni a été réalisé pour comparer les différents groupes de tumeurs en cas de p value inférieure à 0,05 pour le test de Kruskal-Wallis. p-value : * < 0,05

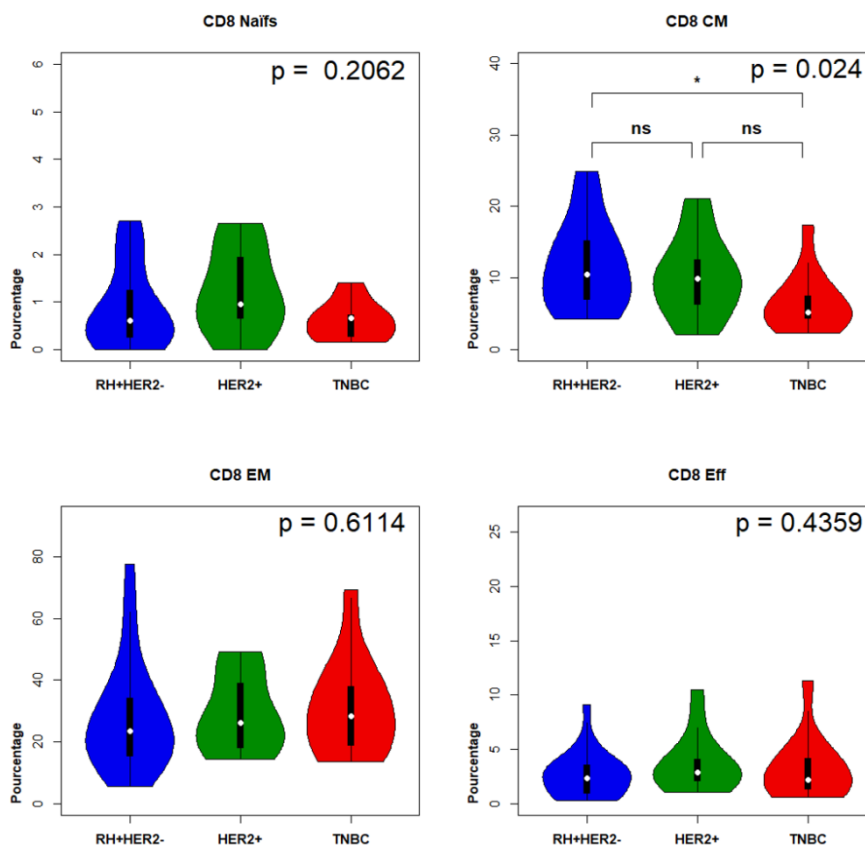


Figure 32

Pourcentage de Lymphocytes T CD8⁺ Naïfs, centraux mémoires, effecteur mémoires et effecteurs mémoires RO⁺. Un test de Kruskal-Wallis a été réalisé pour comparer les 3 groupes de tumeurs entre eux (en haut à droite de chaque graphique). Un test de Mann-Whitney corrigé par la méthode de Bonferroni a été réalisé pour comparer les différents groupes de tumeurs en cas de p value inférieure à 0,05 pour le test de Kruskal-Wallis. p-value : * < 0,05 ; ** < 0,01 ; *** < 0,001 ; **** < 0,0001.

B.3 Corrélation entre l'infiltrat de lymphocytes et les sphingolipides.

Afin d'évaluer l'influence potentielle du métabolisme des sphingolipides sur la réponse immunitaire dans les différents types de cancer du sein, nous avons analysé si l'infiltration de sous-populations lymphocytaires était associée à une signature sphingolipidique dans les tumeurs mammaires. Dans un premier temps, nous avons analysé les corrélations existantes entre les sous-populations lymphocytaires et les lipides totaux dosés. Nous observons dans les TNBC, mais pas dans les deux autres groupes de tumeur, que le C16:0-Cer est inversement corrélé aux lymphocytes T CD4⁺ et aux Treg. A l'opposé, le C16:0-Cer est positivement corrélé aux lymphocytes T CD8⁺ et aux T_{EM} CD8⁺ (Tableau 3 et Figure 33). De plus, nous observons une corrélation positive du C24:0-Cer avec les lymphocytes T CD8⁺ et les T_{EM} CD8⁺ dans les TNBC mais pas les autres tumeurs (Tableau 4). Ces résultats suggèrent que dans les tumeurs TNBC, une augmentation du taux de C16:0-

Cer et de C24:0-Cer est associée à une orientation de la réponse immunitaire vers une réponse cytotoxique et à une diminution de la réponse immunitaire régulatrice.

Etant donné l'influence de la S1P sur la migration et la différenciation des lymphocytes, nous avons ensuite analysé l'existence de corrélation entre les lymphocytes et les dosages de S1P. Nous n'avons pas observé de corrélation entre les dosages de S1P et les sous-populations lymphocytaires dans les tumeurs HER2+. Dans les tumeurs RH+HER2-, la S1P est positivement corrélée avec les Th17 et négativement avec les Th1. La S1P étant connue pour favoriser la différenciation des Th17 (Barra et al., 2018), elle pourrait être impliquée dans le maintien des Th17 dans ce type de tumeur. Dans les TNBC, la S1P est négativement corrélée avec les CD4⁺ et il y a une tendance à la corrélation positive avec les lymphocytes T CD8⁺ (Tableau 5).

Tableau 3

C16:0-céramide

Population T	RH+HER2-		HER2+		TNBC	
	r	p value	r	p value	r	p value
CD4+	0,1798	0,4116	-0,2797	0,3789	-0,6993	0,0142
Th17	0,2037	0,3513	0,2378	0,4573	-0,3427	0,2762
Th17/FoxP3+	0,3468	0,1049	0,3287	0,2973	-0,2098	0,5137
Th2	-0,001483	0,9946	-0,4615	0,134	-0,3566	0,256
Treg FoxP3+	0,1903	0,3845	0,2867	0,3663	-0,627	0,0325
Th1	-0,2333	0,2841	0,3427	0,2762	-0,2098	0,5137
Th1/17	0,009884	0,9643	0,6561	0,0236	-0,1579	0,6221
CD8+	-0,2105	0,3351	0,3706	0,2367	0,7622	0,0055
CD8 EM	-0,1403	0,5231	0,1049	0,7493	0,6923	0,0155
CD8 CM	0,251	0,248	0,4825	0,1154	0,2837	0,369
CD8 EMRA	-0,3328	0,1207	-0,09091	0,783	0,1366	0,6708
CD8 naïfs	-0,2989	0,1659	0,3888	0,2111	-0,4877	0,1099

Tableau récapitulatif des corrélations de Spearman entre les dosages de C16:0-céramide et les paramètres immunitaires mesurés par cytométrie en flux.

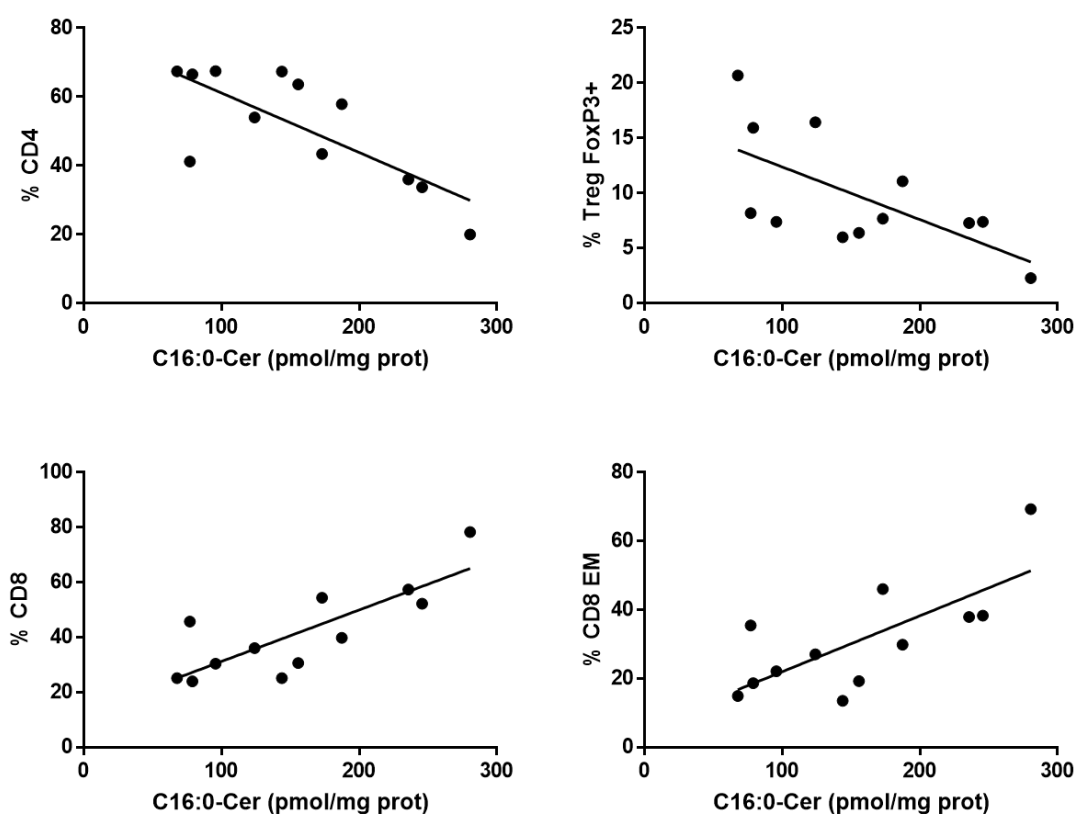


Figure 33
 Graphique représentant les corrélations entre le taux de C16:0-céramide et le pourcentage de lymphocytes T CD4⁺, Treg FoxP3⁺, T CD8⁺ et T_{EM} CD8⁺ dans les TNBC.

Tableau 4

Population T	C24:0-céramide					
	RH+HER2-		HER2+		TNBC	
	r	p value	r	p value	r	p value
CD4+	0,3656	0,0862	-0,2028	0,528	-0,3287	0,2973
Th17	0,2714	0,2104	0,2797	0,3789	0,3147	0,3194
Th17/FoxP3+	0,1215	0,5806	-0,02797	0,9388	0,3077	0,331
Th2	0,2902	0,1792	0,4196	0,1767	0,3566	0,256
Treg FoxP3+	0,2931	0,1748	-0,2657	0,4042	-0,0035	0,9961
Th1	-0,1468	0,5039	-0,1748	0,5881	-0,1678	0,6039
Th1/17	-0,1626	0,4586	-0,01411	0,9687	-0,0667	0,8381
CD8+	-0,3814	0,0725	0,3287	0,2973	0,6224	0,0347
CD8 EM	-0,3172	0,1403	0,3077	0,331	0,6014	0,0428
CD8 CM	0,2747	0,2046	-0,06294	0,8515	0,1541	0,6302
CD8 EMRA	-0,2616	0,2279	0,2867	0,3663	0,2522	0,4256
CD8 naïfs	-0,1232	0,5753	0,3398	0,2783	0,0954	0,7681

Tableau récapitulatif des corrélations de Spearman entre les dosages de C24:0-Céramide et les paramètres immunitaires mesurés par cytométrie en flux.

Tableau 5

Population T	S1P					
	RH+HER2-		HER2+		TNBC	
	r	p value	r	p value	r	p value
CD4+	-0,01908	0,9312	-0,1678	0,6022	-0,5806	0,0477
Th17	0,5977	0,0026	0,1071	0,7404	-0,2849	0,3695
Th17/FoxP3+	0,2432	0,2635	0,2707	0,3949	-0,1556	0,6291
Th2	0,2756	0,2031	-0,1758	0,5848	-0,4955	0,1014
Treg FoxP3+	0,1281	0,5602	0,05369	0,8684	-0,3349	0,2872
Th1	-0,4703	0,0235	-0,0343	0,9156	-0,1227	0,7041
Th1/17	-0,06669	0,7624	0,07279	0,8221	0,0954	0,768
CD8+	0,03319	0,8805	0,3482	0,2674	0,5219	0,0818
CD8 EM	-0,02726	0,9017	0,3991	0,1988	0,3867	0,2143
CD8 CM	0,1796	0,4121	-	0,9015	0,3491	0,266
CD8 EMRA	-0,1092	0,6199	-0,2169	0,4983	0,4579	0,1344
CD8 naïfs	0,1138	0,605	-0,2185	0,4951	-0,3927	0,2067

Tableau récapitulatif des corrélations de Spearman entre les dosages de S1P et les paramètres immunitaires mesurés par cytométrie en flux.

B.4 Topologie de l'infiltrat lymphocytaire CD8⁺

Nous avons, en parallèle de l'analyse par cytométrie en flux, examiné l'infiltrat de TIL CD8⁺ par IHC sur les coupes de tumeurs, afin d'évaluer (i) la topologie de l'infiltration des lymphocytes T CD8⁺ dans les tumeurs et (ii) l'influence potentielle des sphingolipides sur cette topologie.

Nous avons réalisé une étude globale sur l'ensemble des tumeurs mammaires en formant deux groupes selon le degré d'infiltration des lymphocytes T CD8⁺ intratumoraux. La proportion de TILs CD8⁺ est variable avec une médiane de 40%. Ainsi, nous avons défini un groupe de tumeur avec une faible infiltration de TILs CD8⁺ (inférieur à la médiane ; n=15 tumeurs) et un groupe avec une forte infiltration de TILs (supérieur ou égale à la médiane ; n=39).

Tandis que les taux de C16:0-Cer sont identiques dans les deux groupes de tumeur, les taux de C24:0-Cer et de S1P dans les tumeurs sont plus élevés dans le groupe faiblement infiltré par les TIL CD8⁺ (Figure 34). Il est à noter que nous observons un taux plus élevé d'autres espèces de SL en -C24:0, comme le C24:0-dhCer et la C24:0-dhSM (résultats non montrés). Ces résultats suggèrent que la topologie d'infiltration des TIL CD8⁺ dans la tumeur pourrait être négativement influencée par certains métabolites sphingolipidiques comme la S1P et le C24:0-Cer. A l'inverse, d'autres espèces sphingolipidiques comme le C16:0-Cer ne semble pas influencer cette topologie (Figure 34).

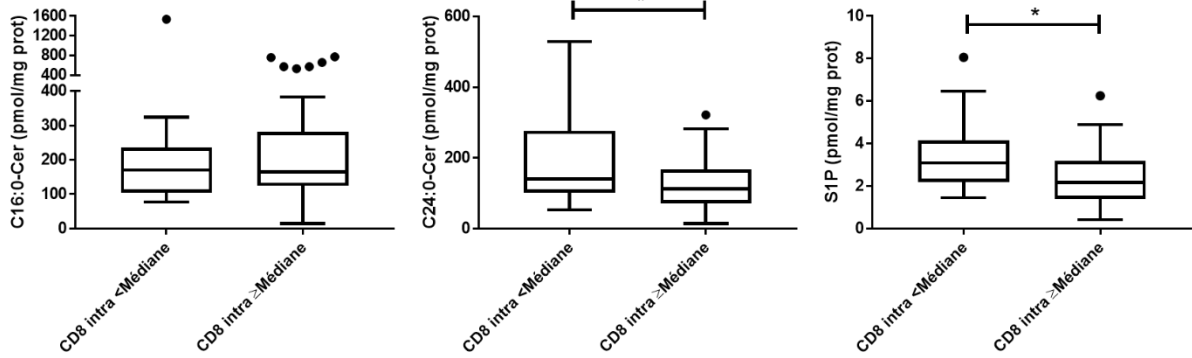


Figure 34

Taux de S1P, de C16:0-céramide et de C24:0-céramide en fonction de la topologie d'infiltration intratumorale des lymphocytes T CD8⁺. Les taux de C16:0-céramide (figure de gauche), de C24:0-céramide (figure du milieu) et de S1P (figure de droite) sont représentés pour les 2 groupes de tumeurs, faiblement (CD8 intra < Médiane) ou fortement (CD8 intra ≥ Médiane) infiltrées par les lymphocytes T CD8⁺. Un test de Mann-Whitney a été réalisé. p-value : * < 0,05.

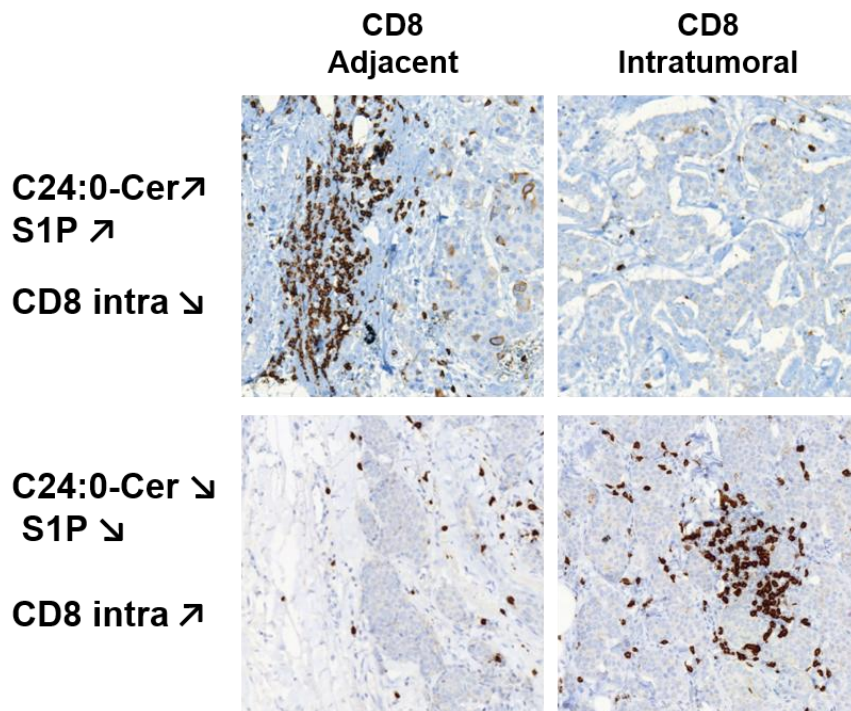


Figure 35

Marquage des TIL CD8⁺ en IHC. Deux exemples d'immunomarquages avec un marquage des TIL CD8⁺ au niveau adjacent et intratumoral (x20).

B.5 Diminution de l'expression des S1PR après activation lymphocytaire

Compte tenu du rôle de la S1P dans la migration des lymphocytes T *via* la stimulation des S1PRs, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'activation des lymphocytes T CD8⁺ pourrait réguler sélectivement l'expression des S1PRs et ainsi affecter la topologie d'infiltration. Nous avons utilisé des lymphocytes T, triés à partir d'un concentré leucoplaquettaire de donneuses saines, que nous avons mis en culture et stimulés avec un anti-CD3/CD28 pendant différents temps (de 1, 2 et 6 jours). Nous avons ainsi pu noter, dès le

premier jour suivant l'engagement du TCR et du CD28, et de manière soutenue dans le temps (données non montrées), l'expression des transcrits codant *S1PR1*, *S1PR4* et *S1PR5* est fortement diminuée. A l'opposé, l'expression des transcrits codant *S1PR2* reste constante dans nos conditions expérimentales (Figure 36). Il est à noter que l'expression du transcrit codant *S1PR3* n'est pas détectable. Bien que préliminaires, ces résultats suggèrent qu'après activation des lymphocytes T CD8⁺ au contact d'une cellule présentatrice d'antigène, les lymphocytes perdent l'expression des récepteurs à la S1P promigrateurs et que, l'expression maintenue de S1P2, décrit comme inhibant la migration cellulaire (Drouillard et al., 2018), bloque les lymphocytes T CD8⁺ à l'extérieur de la tumeur en cas de concentration intratumorale élevée de S1P.

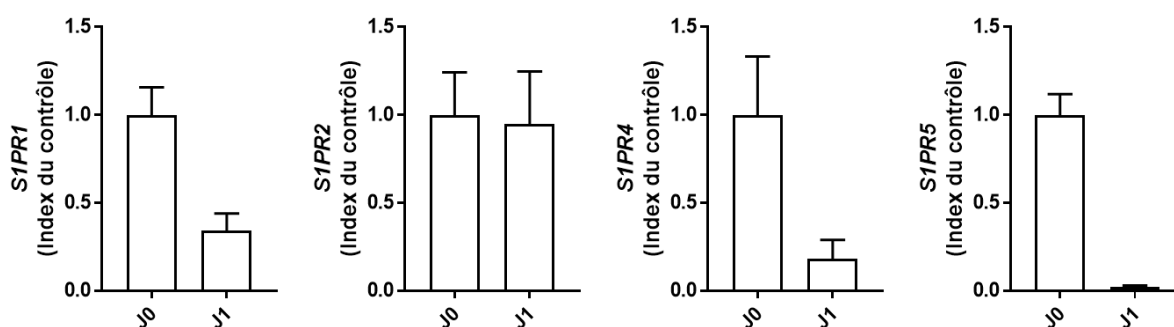


Figure 36

Expression de l'ARNm codant les récepteurs de la S1P après stimulation du TCR et de CD28. Les lymphocytes T triés ont été stimulés par un anti-CD3/CD28. L'expression d'ARNm codant pour *S1PR1*, *S1PR2*, *S1PR4* et *S1PR5* a été mesurée à J0 sans stimulation puis à J1 après stimulation. L'expression des S1PR est rapportée à l'expression de la *GAPDH* comme gène de référence puis comparé au temps J0 pour l'index d'expression (n=3 donneuses).

B.6 Conclusion de la partie sphingolipides et réponse immunitaire

Bien que les tumeurs TNBC et HER2+ soient plus infiltrées que les tumeurs RH+HER2-, nous n'avons pas observé de différences majeures entre les types de cancers du sein dans les proportions des sous-populations lymphocytaires infiltrant la tumeur.

De manière remarquable, nous avons pu mettre en évidence pour la première fois une corrélation positive entre les taux de certains céramides et une réponse cytotoxique dans les tumeurs TNBC. Cette observation n'est toutefois pas généralisable à tous les types de cancers mammaires. De plus, nous avons observé qu'un taux élevé de S1P dans les biopsies de tumeurs mammaires est associé à une faible infiltration intratumorale par les lymphocytes T CD8⁺ évaluée par IHC. Nous avons aussi observé que, consécutivement à l'activation de

lymphocytes T CD8⁺ purifiés, l'expression d'ARNm codant les récepteurs S1P1, S1P4 et S1P5, mais pas S1P2, est diminuée par rapport à des lymphocytes non stimulés.

L'ensemble de nos observations nous amènent à proposer un modèle dans lequel les lymphocytes activés sont bloqués à l'extérieur de la tumeur par S1P2 en cas d'une forte production de S1P dans les tumeurs (Figure 37). Toutefois, ce modèle hypothétique reste à valider par des approches pharmacologiques ou génétiques ciblant le S1P2 dans des modèles murins de cancer du sein.

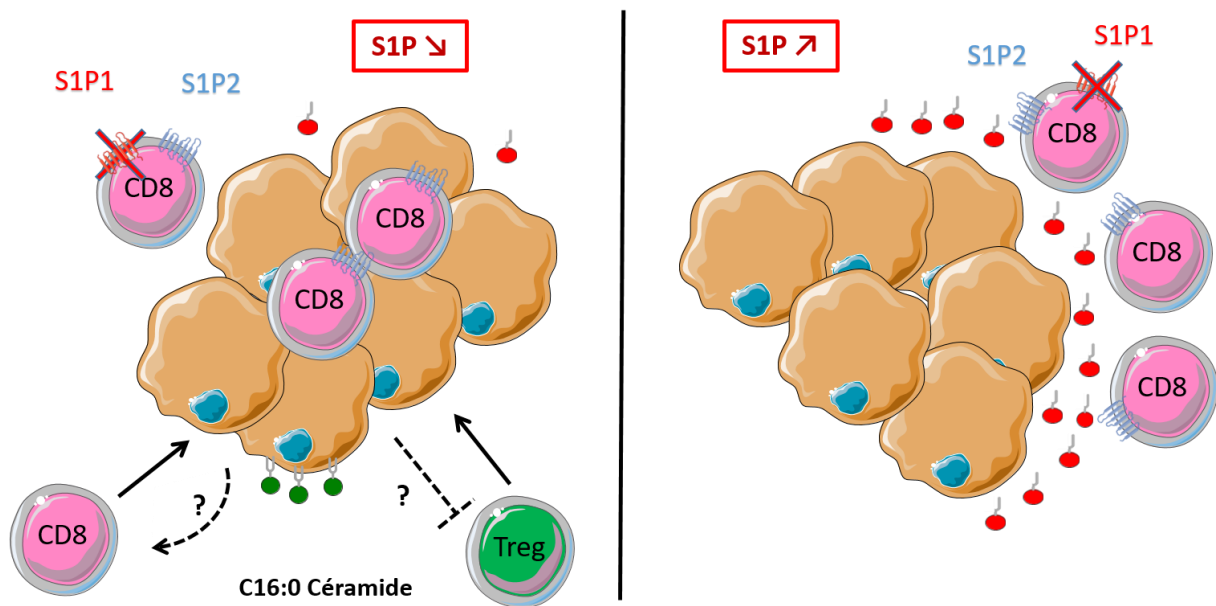


Figure 37

Blocage de l'infiltration des TIL CD8⁺ par la S1P produite par les tumeurs mammaires. A gauche, une tumeur qui produit peu de S1P, les lymphocytes T CD8⁺ peuvent rentrer à l'intérieur des tumeurs et exercer leur activité cytotoxique. A droite, une tumeur qui produit beaucoup de S1P, les lymphocytes T CD8⁺ sont bloqués à l'extérieur des tumeurs et ont une activité cytotoxique limitée à la bordure tumorale. L'effet du C16:0-céramide sur le recrutement des TIL CD8⁺ et sur l'inhibition du recrutement des Tregs dans la tumeur passe par un effet inconnu.

DISCUSSION

A. Première partie

Nous avons montré que les taux de sphingolipides étaient plus élevés dans les tumeurs que dans du tissu sain prélevé à distance des tumeurs. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par l'équipe de K. Takabe. Dans une première étude, ils avaient montré qu'il y avait plus de sphingolipides simples (S1P, Sphingosine, sphinganine, sphinganine-1-phosphate) et de sphingolipides complexes (Hexosylcéramide, SM, Céramide) dans du tissu sain que du tissu cancéreux (Nagahashi et al., 2016). Nous avons dosé dans notre étude le dhCer qui n'avait pas été dosé par Nagahashi et al. et pour lequel nous ne retrouvons pas de différence entre du tissu sain et tumoral. Toutefois, dans une étude plus récente, la même équipe a montré que le taux de dhCer était augmenté dans du tissu tumoral par rapport à du tissu sain. Les mêmes auteurs ont aussi montré que le taux de céramide peut servir de biomarqueur des cancers du sein en discriminant le tissu tumoral du tissu sain ou du tissu péri-tumoral (Moro et al., 2018). Pour expliquer ces différences, les auteurs ont analysé l'expression d'ARNm de la plupart des enzymes du métabolisme des SL dans la base de données de la cohorte TCGA. D'après ces analyses, les 2 seules enzymes moins exprimées dans le cancer du sein que dans du tissu sain sont *CERK* et *CERS3*. Il semble peu probable que la diminution de l'expression de ces deux enzymes dans le cancer du sein soit responsable de l'augmentation des taux de SL. Une mesure de l'activité enzymatique dans les tissus sains et cancéreux seraient plus appropriées pour déterminer les bases moléculaires à l'origine de l'augmentation des SL dans les cancers mammaires.

Il n'existe pas actuellement d'étude comparative des taux de SL entre les différents sous-types histologiques de tumeurs mammaires. Cependant plusieurs études ont mis en évidence des niveaux d'expression différents de gènes codant pour des enzymes du métabolisme des SL en fonction de certains sous-types de tumeurs. Ainsi, l'expression d'ARNm codant pour *SPHK1* est plus élevée dans les tumeurs « basal-like », et donc a fortiori dans les TNBC, que dans les autres cancers du sein (Datta et al., 2014). Cette augmentation d'expression devrait entraîner une augmentation de la production de S1P dans les TNBC. Toutefois, nous n'avons pas observé de taux plus élevés de S1P dans les TNBC en comparaison aux autres sous-types histologiques de cancers du sein.

Parmi les autres enzymes du métabolisme des SL dont l'expression est différente en fonction des groupes de cancers, nous avons aussi remarqué que l'expression d'*UGCG* est plus élevée dans les cancers non TNBC. L'expression d'*UGCG* avait déjà été montrée comme

plus importante dans les cancers du sein ER+ (Ruckhaberle et al., 2008). Une autre étude en IHC avait noté que l'expression de la GCS était plus souvent positive dans les tumeurs de type luminal A (Liu et al., 2014). Toutefois, nous n'avons pas observé de taux de monohexosylcéramide plus élevé dans les cancers RH+HER2-. Nous avons cependant observé qu'il existait une forte corrélation entre les taux de céramide et d'HexCer dans les tumeurs RH+HER2-. Il est possible que le GlcCer (en théorie l'hexosylcéramide majoritaire) soit rapidement métabolisé en glycosphingolipides complexes, incluant les gangliosides (non dosés dans notre étude), dans les tumeurs RH+. Ainsi, nos observations sont en faveur d'une orientation du métabolisme du céramide vers les glycosphingolipides et les gangliosides dans les tumeurs RH+.

Les tumeurs TNBC ont également une augmentation de l'expression d'*UGT8*, l'enzyme qui réalise la synthèse du GalCer (Ruckhaberle et al., 2008). Il n'est pas possible de faire facilement la différence entre le GlcCer et le GalCer par spectrométrie de masse puisque le glucose et le galactose ne diffèrent que par leur stéréochimie mais pas par leur masse moléculaire. Des approches ont été développées récemment mais que nous n'avons pas pu utiliser dans notre étude (Boutin et al., 2016 ; von Gerichten et al., 2017). En général, il y a plus de GlcCer que de GalCer dans les tissus sauf pour les reins, les ganglions lymphatiques et le cerveau (von Gerichten et al., 2017). Il n'existe pas d'étude à l'heure actuelle ayant analysé la proportion de GlcCer et de GalCer dans les différents cancers du sein. Ces approches seraient intéressantes pour pouvoir confirmer l'hypothèse de l'orientation préférentielle du métabolisme du céramide vers le GlcCer dans les tumeurs RH+ et, potentiellement, vers le GalCer dans les tumeurs TNBC.

Une autre étude s'est intéressée aux taux de céramide et montre que les taux élevés de céramide en -C16:0 et -C24:0 sont responsables de l'augmentation du taux de céramide dans les cancers du sein (Schiffmann et al., 2009). Dans cette étude, la cause de l'augmentation du taux de céramide en -C16:0 et -C24:0 était reliée à l'augmentation de l'expression de *CERS2*, *CERS4* et *CERS6* dans les cancers du sein par rapport à du tissu sain. *CERS2* peut utiliser des acyl-CoA en -C24 et *CERS4* en -C18 à -C22. *CERS6* utilise surtout des acyl-CoA en -C16. Dans l'étude de Moro et al., on peut voir que les céramides synthases les plus exprimées sont dans l'ordre, *CERS2*, *CERS6*, *CERS4* et *CERS5*. *CERS1* et *CERS3* sont beaucoup moins exprimées que les autres céramide synthases. En partant du principe que *CERS2* est la céramide synthase la plus exprimée (Levy et Futerman, 2010), on peut comprendre ces observations pour le céramide en -C24:0. L'augmentation d'expression de *CERS6* et *CERS5*

qui sont moins ubiquitairement et moins fortement exprimées que *CERS2*, peut expliquer l'augmentation des céramides en -C16:0.

Dans notre étude, nous avons non seulement comparé le taux des SL par rapport à des échantillons de tissu sain mais nous avons aussi comparé ces taux dans différents groupes de cancers entre eux. Nous n'avons pas observé de différence entre les dosages de SL totaux parmi les différents groupes de tumeurs à l'exception d'une augmentation des taux de S1P dans les cancers RH+ par rapport aux HER2+ et des taux d'hexCer dans les TNBC par rapport aux HER2+. Pour la première fois, nous avons identifié que le taux de SL complexes en -C24:0 est plus important dans les cancers du sein TNBC par rapport aux autres cancers. Une des hypothèses pour expliquer ces différences pourrait venir d'une différence dans l'utilisation des Acyl-CoA par les céramide synthases.

Une étude a déjà montré une augmentation de l'expression de *CERS4* et *CERS6* dans les cancers ER+ par rapport aux ER- (Ruckhaberle et al., 2008). La même équipe a montré que les dosages des céramides en -C18:0 et -C20:0 étaient plus élevés dans les cancers ER+ par rapport aux cancers ER- (Schiffmann et al., 2009). Ces observations peuvent concorder car *CERS4* utilise des acyl-CoA en -C18:0 et -C20:0. Il est toutefois étonnant que, malgré l'augmentation d'expression de *CERS6* dans les tumeurs ER+, il n'y a pas de différence pour le dosage du C16:0-cer entre les tumeurs ER+ et ER-. Dans l'étude de Schiffmann et al., il n'y a pas non plus d'augmentation du C24:0-Cer dans les cancers ER-. Dans notre méta-analyse, nous avons retrouvé une baisse de l'expression de *CERS2*, *CERS4*, *CERS5* et *CERS6*, mais pas de différence de l'expression de *CERS1* et *CERS3*, dans les cancers TNBC par rapport aux autres cancers. Ainsi, les céramide synthases les plus ubiquitaires sont aussi celles pour lesquelles l'expression est plus faible chez les TNBC. *CERS1* a une expression forte presque exclusivement dans le cerveau mais sa baisse a été impliquée dans la physiopathologie de la prolifération des carcinomes non squameux de la tête et du cou (Koybasi et al., 2004). *CERS3* est surtout exprimée par les kératinocytes lors de leur maturation mais aussi dans les cellules germinales. *CERS2* et *CERS4* vont générer du dhCer et du Cer en -C18 à -C24. Puisque ces enzymes sont abaissées dans les TNBC, elles ne devraient pas contribuer de façon majeure à l'augmentation des C24:0-SL. Toutefois, il est possible que la baisse d'expression de *CERS5* et *CERS6* soit plus importante que celle de *CERS2* et *CERS4*, créant ainsi un déséquilibre vers l'accumulation des C24:0-SL. L'expression de *CERS3* n'est pas abaissée dans les TNBC et *CERS3* peut aussi utiliser des Acyl-CoA en -C24:0 pour générer du C24:0-dhCer et du C24:0-Cer. Cependant, l'expression de *CERS3* dans les cancers du sein est vraisemblablement très

faible et le maintien de son expression dans les TNBC ne devrait contribuer qu'en partie à nos observations. Les tumeurs « basal-like » ou TNBC sont associées au phénomène de transition épithéliomésenchymateuse (EMT) (Sarrío et al., 2008). La diminution de l'expression de *CERS6* a été reliée à l'EMT dans les cancers du sein et à une diminution de la production de C16:0-SL au profit des C24:0-SL (Edmond et al., 2015). Ainsi, tandis que la surexpression de *CERS6* dans les lignées TNBC s'accompagne d'une augmentation du C16:0-Cer et d'une diminution de C24:0-Cer, l'interférence ARN de *CERS6* dans des lignées non TNBC induit l'effet opposé. De plus, la diminution de *CERS6* dans les lignées de TNBC contribue à l'augmentation de la fluidité membranaire et à la motilité de ces cellules (Edmond et al., 2015). Ainsi, la diminution de l'expression de *CERS6* pourrait jouer un rôle majeur dans l'augmentation des C24:0-SL que nous observons dans les TNBC.

Il est également possible qu'il y ait des modifications post-traductionnelles régulant l'activité des céramide synthases. Les céramide synthases *CERS2-6* peuvent être phosphorylées dans une région C-terminale et cette phosphorylation entraîne une augmentation de l'activité enzymatique. Cette phosphorylation est très importante pour l'activité de *CERS2* (Sassa et al., 2016). D'autres facteurs peuvent réguler l'activité des céramide synthases comme, les protéines *ORMDL*, qui diminuent la synthèse des sphingolipides par la voie *de novo* (Cai et al., 2016), et l'*ACBP* (« acyl-CoA binding protein »), qui augmente l'activité de *CERS2* et *CERS3* (Ferreira et al., 2017).

Curieusement, nous avons identifié qu'il y avait une augmentation de l'expression d'ARNm codant pour les 3 élongases (*ELOVL1*, *ELOVL3*, *ELOVL7*) qui participent à l'élongation des acides gras libres saturés à partir de C18 dans les TNBC par rapport aux autres cancers. Il a été montré qu'*ELOVL1* est l'élongase la plus importante pour la synthèse des SL en -C24:0 (Ohno et al., 2010). Il a également été montré récemment qu'il y a plus d'acide gras libres en -C24:0 et -C26:0 dans les tumeurs TNBC que dans les tumeurs RH+ (Yamashita et al., 2017). Dans cette même étude, l'expression d'*ELOVL6* était plus forte dans les TNBC que les tumeurs RH+. Nous ne retrouvons pas exactement les mêmes résultats dans bc-GenExMiner mais les cohortes sont différentes. Il faut noter tout de même que l'expression d'*ELOVL6* en IHC a été associée à un pronostic péjoratif dans une autre étude sur 70 tumeurs mammaires (Feng et al., 2016). Dans tous les cas, l'expression forte des élongases ainsi que la quantité et la longueur des différents Acyl-CoA disponibles pourraient expliquer aussi l'augmentation des C24:0-SL dans les TNBC.

Nous pourrions vérifier dans nos échantillons, le dosage des acides gras libres, l'expression des gènes des élongases, ou mesurer l'activité d'élongation pour étayer notre hypothèse. Il serait intéressant d'évaluer s'il existe une augmentation de l'expression d'*ELOVL1*, *ELOVL3* et *ELOVL7* dans les lignées de cancers triple négatifs par rapport à des lignées de cancers RH+. Des expériences d'interférence ARN ciblant les différentes isoformes de ces élongases dans des lignées de TNBC permettraient de déterminer quelle(s) élongase(s) contribu(ent) à l'accumulation des C24:0-SL et pourraient diminuer les capacités migratoires de ces cellules en modifiant notamment la composition sphingolipidique des membranes. A terme, une stratégie pharmacologique visant à inhiber les élongases identifiées pourrait être développée dans une perspective thérapeutique des TNBC.

B. Deuxième partie

Nous avons essayé de mettre en évidence des liens entre la réponse immunitaire et les variations des SL dans les cancers du sein. Nous avons notamment mis en évidence que dans les cancers du sein de type TNBC, les taux de C16:0-Cer et C24:0-Cer étaient corrélés positivement à une proportion plus importante de l'infiltrat de TIL CD8⁺ et plus particulièrement des T_{EM} CD8⁺ et négativement avec les Treg (mais pas les Th1, Th2 et les Th17).

Il a été montré que des lymphocytes T CD4⁺ déficients pour *CERS6* présentaient un contenu en C16:0-Cer était plus bas que chez des souris contrôles. Ils induisaient moins d'inflammation dans un modèle de colite chez la souris probablement par un défaut de prolifération. Les lymphocytes T CD8⁺ n'avaient pas été étudiés dans ce contexte, mais la déficience en *CERS6* pourrait aussi affecter la prolifération de plusieurs types cellulaires (Scheffel et al., 2017). Dans un autre modèle d'allogreffe de moelle osseuse, il a été montré que l'expression de *CERS6* dans des ly T contribuait à l'activation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et participait à la réaction du greffon contre l'hôte (GVH) (Sofi et al., 2017). Ces 2 modèles ont majoritairement étudié l'effet de la déficience de *CERS6* sur les fonctions des lymphocytes T directement. La production de C16:0-Cer est donc lié à une réponse lymphocytaire plus importante. Pourtant, dans un modèle de colite, indépendante des Ly T, induite par le sel sodique de dextran (DSS) la déficience de la souris en *CERS6* augmente l'inflammation par une augmentation de la production de S1P et un recrutement accru des polynucléaires neutrophiles (Helke et al., 2018). Le céramide pourrait influencer

différemment les réactions immunitaires en fonctions des types de cancers par une interaction avec d'autres types cellulaires ou d'autres voies du métabolisme des sphingolipides.

L'injection de nanoliposomes contenant du C6-céramide chez des souris avec des tumeurs hépatiques a été utilisée pour renforcer la réponse immunitaire anti-tumorale. L'effet du nanoliposome repose sur un changement de polarisation des macrophages vers un phénotype M1, anti-tumoral, et une meilleure activation des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'antigènes tumoraux en retour (Li et al., 2018). Il semble que la formulation du céramide soit importante pour qu'il puisse avoir un effet sur la réponse immunitaire. Par ailleurs, il a été montré que les ceramides de synthèse à chaînes courtes -C6 et -C8 mais pas à chaînes -C16 et -C24 pouvait faciliter le maintien de l'expression de FoxP3 dans des Tregs (Kue et al., 2013). Le C6-Cer est perméant, c'est-à-dire, qu'il peut facilement s'intégrer dans les membranes de cellules eucaryotes. Il est métabolisable en céramide naturel après dégradation par les céramidases en sphingosine qui est réutilisée comme substrat des céramide synthèses par la voie de sauvetage des SL. Ainsi, il est possible que certains des effets du C6-Cer soit médiés par les céramides endogènes résultants de la métabolisation du C6-Cer. Cette métabolisation pourrait être différente dans les cellules normales et dans les divers types de cancer du sein du fait notamment des altérations de l'expression des céramides synthèses et des élongases. Il a également été montré que le céramide produit par la SMase acide, dont l'activité était induite par le TNF- α , pouvait être transformé en C1P par la céramide kinase, et augmenter la production de CCL5 et d'autres chimiokines proinflammatoires (Newcomb et al., 2018). Ce mécanisme pourrait aussi expliquer pourquoi le céramide participe à la présence de TIL CD8⁺ dans les TNBC. Il faudrait que nous analysions la quantité d'ARNm produit par les cellules tumorales en fonction du taux de céramide ou de C16:0-Cer pour étayer cette hypothèse

Récemment, l'utilisation d'une chimiothérapie (avec utilisation d'anthracyclines) en combinaison avec un anti-PD-1 a montré une réponse globale de 90% chez les premiers patients avec un cancer TNBC dans l'étude KEYNOTE 173 (Schmid et al., 2017). L'étude KEYNOTE-522 qui prévoit de comparer dans une étude de phase 3 l'efficacité d'une chimiothérapie avec un anti-PD-1 par rapport à une chimiothérapie seule devrait débiter prochainement (Schmid et al., 2018). Dans tous les cas, le rationnel de ce type de stratégie thérapeutique repose sur l'utilisation de chimiothérapie pour induire une réponse immunitaire et des ICI pour pallier à l'immunosuppression induite dans le microenvironnement des cancers du sein (Vonderheide et al., 2017). Etant donné que les anthracyclines augmentent les taux de céramide dans les cellules cancéreuses, il serait intéressant de pouvoir analyser dans

une cohorte de patients traités par immunothérapie si la génération de céramide par les anthracyclines est un biomarqueur prédictif de l'efficacité des immunothérapies. De plus, il existe des voies de métabolisation du céramide vers les glucosylcéramides ou la S1P qui contribuent à la résistance à la cytotoxicité induite par la doxorubicine (Lucci et al., 1999 ; Katsuta et al., 2017). Ainsi, en considérant que le céramide augmente l'immunogénicité des tumeurs par des mécanismes encore méconnus, ces voies de métabolisation du céramide pourraient aussi contribuer à des mécanismes d'immunoéchappement et de résistance aux ICI en combinaison avec les anthracyclines. Des travaux encore non publiés de mon équipe d'accueil montrent que la surexpression de la sphingomyélinase neutre 2, une enzyme permettant d'augmenter les taux de C16:0-Cer et dont l'expression est augmentée par les anthracyclines (Shamseddine et al., 2015), sensibilise les 4T1, une lignée muine de TNBC, aux anti-PD-1. De manière intéressante, nous montrons une corrélation entre l'expression de *SMPD3*, le gène codant pour la sphingomyélinase neutre 2, et l'expression des gènes reflétant l'infiltration intratumorale des lymphocytes T CD8 comme *CD8A* et *CD8B* dans les TNBC. Prochainement, nous évaluerons l'impact de la surexpression de la sphingomyélinase neutre 2 dans les lignées 4T1 sur les TILs et les mécanismes permettant d'augmenter l'immunogénicité des TNBC.

La S1P et ses récepteurs jouent un rôle majeur dans la circulation et la différenciation des lymphocytes (Garris et al., 2014). Notre équipe a montré dans des modèles pré-cliniques de mélanome que la production de S1P *via* la Sphk1 par les cellules de mélanomes influence la polarisation des macrophages vers un phénotype M2, protumoral, en favorisant la production de TGF- β et diminue de ce fait la réponse immunitaire adaptative dans les tumeurs (Mrad et al., 2016). Des résultats récents montrent que l'inhibition épigénétique ou pharmacologique de la Sphk1 permet d'augmenter l'infiltration et l'activation des T CD8 dans la tumeur et la sensibilité aux ICI (anti-PD-1, anti-CTLA-4) (Imbert et al., en révision). Nous avons mis en évidence que l'inhibition de SK1 entraîne une diminution de l'expression de plusieurs facteurs immunosuppresseurs comprenant PGE2, TGF- β , IL-10, CCL-22 et CCL-17 et par conséquent l'accumulation des Treg dans la tumeur chez la souris. Ainsi, ces 2 études positionnent l'axe Sphk1/S1P comme un élément essentiel des interactions entre le microenvironnement et les cellules tumorales dans la réponse immunitaire anti-tumorale.

Ces résultats sont en accord avec une autre étude qui a montré le rôle de la voie S1P/S1P1 sur les Treg intratumoraux dans un modèle de tumeur mammaire EO771 chez la souris. Ainsi, les auteurs ont montré que chez des souris avec des lymphocytes T déficients pour le

récepteur S1P1 (*S1pr1*^{-/-}), les Treg sont séquestrés dans les ganglions drainant la tumeur et moins présents à l'intérieur de la tumeur par rapport aux souris *S1pr1*^{+/+}. A l'inverse, la surexpression de *S1pr1* dans les lymphocytes T entraîne une accumulation de Treg et une baisse des lymphocytes T CD8⁺ dans les tumeurs *via* un mécanisme dépendant de STAT3. Les auteurs n'ont toutefois pas réussi à montrer que la S1P induit la migration des Treg, ce qui ne permet pas d'impliquer avec certitude l'axe S1P/S1PR1 dans la migration des Treg dans la tumeur (Priceman et al., 2014). Une autre étude montre également que des Treg issus de la moelle osseuse de patientes atteintes de cancer du sein expriment le récepteur S1P1. Après une stimulation par le TCR et en présence d'APC, ces Treg augmentent l'expression de S1P1 et migrent en réponse à la S1P (Rathinasamy et al., 2017). Bien que la S1P en agissant sur S1P1 semble impliquée dans l'infiltration des Treg, nos données ne permettent pas d'impliquer la S1P dans le recrutement des Treg dans des tumeurs de cancers du sein humaines. Cependant, nous avons uniquement réalisé des corrélations et pas d'étude mécanistique. A l'heure actuelle, il n'existe pas de données permettant de savoir si les Treg expriment, ou non, S1P1 et si ce récepteur est impliqué dans le recrutement des Treg dans des tumeurs humaines. En revanche, nous avons observé que dans les tumeurs TNBC qui produisent en théorie le plus de S1P, les TIL CD8⁺ étaient plus nombreux. L'augmentation de la néoangiogénèse causée par la S1P (Nagahashi et al., 2012) pourrait aussi favoriser l'arrivée des TILs CD8⁺ au niveau tumoral ainsi que d'autres populations immunitaires. Il est possible également que les TIL CD8⁺ soient recrutés par la S1P *via* l'engagement du récepteur S1P1.

A l'heure actuelle, certaines études sont en faveur d'un rôle pronostic positif d'une forte infiltration intratumorale des TIL et non seulement de l'infiltration stromale. La valeur pronostic varie selon les études mais est plus souvent retrouvée positive dans les TNBC (Loi et al., 2013 ; Dieci et al., 2015), mais parfois aussi dans les tumeurs RH+ (Eryilmaz et al., 2018 ; Khoury et al., 2018). Nous avons identifié que les taux de S1P étaient plus bas entre des tumeurs avec une forte infiltration de TIL CD8⁺ intratumoraux par rapport aux tumeurs avec une faible infiltration de TIL CD8⁺ intratumoraux.

Nous avons aussi montré *in vitro* que dans des lymphocytes T activés, l'expression du récepteur *S1PR2* n'était pas diminuée après une stimulation par le TCR, contrairement à celle de *S1PR1*, *S1PR4* et *S1PR5*. Nos résultats n'ont été obtenus qu'avec 3 donneuses, ce qui ne nous a pas permis d'obtenir une différence statistiquement significative mais il est fort probable qu'en répétant cette expérience, nos observations soient confirmées. Les populations de lymphocytes T mémoires, qui expriment *S1PR2* mais pas *S1PR1*, ont une migration

inhibée par la S1P. Il est possible de rétablir la migration des lymphocytes T en réponse à la S1P en bloquant le récepteur S1P2 par un antagoniste pharmacologique, le JTE-013. De plus, les auteurs ont montré que le récepteur S1P2 pouvait inhiber la migration des lymphocytes T en réponse à la chimiokine CXCL12 (Drouillard et al., 2018). Ainsi, il est possible que nos observations sur le blocage des lymphocytes T CD8⁺ à l'extérieur des tumeurs soient liées à l'expression de S1P2 par les TIL activés. La signalisation S1P/S1P2 pourrait inhiber la migration des TIL CD8⁺ en réponse à CXCL9 et CXCL10. Afin de confirmer l'hypothèse du blocage des TIL à l'extérieur de la tumeur par la S1P, il serait intéressant de réaliser des tests de migration lymphocytaire en chambre de Boyden avec des TIL extrait de tumeurs et d'utiliser un antagoniste de S1P2 pour voir si la migration des TIL en réponse à une chimiokine est augmentée. La chimiothérapie est connue pour augmenter l'infiltrat des lymphocytes intratumoraux (Dieci et al., 2015). Il serait intéressant d'utiliser un antagoniste de S1P2 pour pouvoir augmenter l'infiltration intratumorale des lymphocytes T CD8 dans ce contexte.

Une limite de notre étude est d'avoir réalisé le dosage de S1P dans la totalité de la tumeur. La S1P produite par SK1 est majoritairement celle qui va être exportée à l'extérieur des cellules. Il a été montré que la glande mammaire de souris déficientes pour *Sphk1* ne présente pas moins de S1P que les souris sauvages. Par contre, il y'a moins de S1P dans le sang et dans le liquide interstitiel de la glande mammaire de ces souris *Sphk1*^{-/-} (Nagahashi et al., 2016). Il serait intéressant de vérifier dans nos échantillons s'il existe une corrélation entre le niveau d'expression protéique de SK1 ou du transcrite de *SPHK1* avec les dosages de S1P réalisés. S'il n'y a pas de corrélation avec la S1P, il faudrait vérifier si le niveau d'expression de la protéine SK1, ou son activité enzymatique, corrèle avec l'infiltration d'une sous-population lymphocytaire T ou la localisation intratumorale de l'infiltrat de TIL CD8⁺. Enfin, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse selon laquelle d'autres enzymes du métabolisme de la S1P (comme la SK2, la S1P lyase ou les S1P phosphatases) soient altérées dans les cancers du sein, contribuant à la production de S1P qui limite l'infiltration intratumorale des lymphocytes T CD8⁺. Dans l'hypothèse où nous n'arriverions pas à confirmer avec nos résultats le lien entre la topologie des TIL et la S1P, il serait intéressant de vérifier en réalisant des dosages de S1P dans le liquide intersititiel de tumeurs mammaires (Nagahashi et al., 2016), si nous obtenons une meilleure corrélation avec l'infiltration intratumorale des TIL CD8⁺.

C. Conclusion

Nous avons pu mettre en évidence une signature sphingolipidique dans les cancers du sein qui soit associée au sous-type TNBC. Nous avons pu également voir que cette signature était aussi caractéristique d'un grade plus avancé.

Nous avons pu mettre en évidence des liens entre la signature sphingolipidique des tumeurs et l'infiltrat immunitaire des cancers du sein en particulier dans les tumeurs TNBC.

Nous proposons ainsi de moduler le métabolisme des sphingolipides pour augmenter la réponse immunitaire anticancéreuse.

D. BIBLIOGRAPHIE

A

- Abboushi, N., A. El-Hed, W. El-Assaad, L. Kozhaya, M. E. El-Sabban, A. Bazarbachi, R. Badreddine, A. Bielawska, J. Usta and G. S. Dbaibo (2004). "Ceramide inhibits IL-2 production by preventing protein kinase C-dependent NF-kappaB activation: possible role in protein kinase C θ regulation." *J Immunol* **173**(5): 3193-3200.
- Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto and G. Napolitani (2007). "Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells." *Nat Immunol* **8**(6): 639-646.
- Adams, S., S. Loi, D. Toppmeyer, D. W. Cescon, M. D. Laurentiis, R. Nanda, E. P. Winer, H. Mukai, K. Tamura, A. Armstrong, M. C. Liu, H. Iwata, L. Ryvo, P. Wimberger, D. Card, Y. Ding, V. Karantza and P. Schmid (2017). "Phase 2 study of pembrolizumab as first-line therapy for PD-L1-positive metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC): Preliminary data from KEYNOTE-086 cohort B." *Journal of Clinical Oncology* **35**(15_suppl): 1088-1088.
- Adams, S., P. Schmid, H. S. Rugo, E. P. Winer, D. Loirat, A. Awada, D. W. Cescon, H. Iwata, M. Campone, R. Nanda, R. Hui, G. Curigliano, D. Toppmeyer, J. O'Shaughnessy, S. Loi, S. Paluch-Shimon, D. Card, J. Zhao, V. Karantza and J. Cortes (2017). "Phase 2 study of pembrolizumab (pembro) monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC): KEYNOTE-086 cohort A." *Journal of Clinical Oncology* **35**(15_suppl): 1008-1008.
- Ahmed, M. and N. K. Cheung (2014). "Engineering anti-GD2 monoclonal antibodies for cancer immunotherapy." *FEBS Lett* **588**(2): 288-297.
- Aili, A., J. Zhang, J. Wu, H. Wu, X. Sun, Q. He, R. Jin and Y. Zhang (2018). "CCR2 Signal Facilitates Thymic Egress by Priming Thymocyte Responses to Sphingosine-1-Phosphate." *Front Immunol* **9**: 1263.
- Ali, H. R., E. Provenzano, S. J. Dawson, F. M. Blows, B. Liu, M. Shah, H. M. Earl, C. J. Poole, L. Hiller, J. A. Dunn, S. J. Bowden, C. Twelves, J. M. Bartlett, S. M. Mahmoud, E. Rakha, I. O. Ellis, S. Liu, D. Gao, T. O. Nielsen, P. D. Pharoah and C. Caldas (2014). "Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients." *Ann Oncol* **25**(8): 1536-1543.
- Allende, M. L., J. L. Dreier, S. Mandala and R. L. Proia (2004). "Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration." *J Biol Chem* **279**(15): 15396-15401.
- Alshaker, H., Q. Wang, S. Srivats, Y. Chao, C. Cooper and D. Pchejetski (2017). "New FTY720-docetaxel nanoparticle therapy overcomes FTY720-induced lymphopenia and inhibits metastatic breast tumour growth." *Breast Cancer Res Treat* **165**(3): 531-543.
- Alvarez, S. E., K. B. Harikumar, N. C. Hait, J. Allegood, G. M. Strub, E. Y. Kim, M. Maceyka, H. Jiang, C. Luo, T. Kordula, S. Milstien and S. Spiegel (2010). "Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2." *Nature* **465**(7301): 1084-1088.
- Ancellin, N., C. Colmont, J. Su, Q. Li, N. Mittereder, S. S. Chae, S. Stefansson, G. Liao and T. Hla (2002). "Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation." *J Biol Chem* **277**(8): 6667-6675.
- Antoon, J. W., J. Liu, M. M. Gestaut, M. E. Burow, B. S. Beckman and M. Foroozesh (2009). "Design, synthesis, and biological activity of a family of novel ceramide analogues in chemoresistant breast cancer cells." *J Med Chem* **52**(18): 5748-5752.

Antoon, J. W., M. D. White, M. E. Burow and B. S. Beckman (2012). "Dual inhibition of sphingosine kinase isoforms ablates TNF-induced drug resistance." *Oncol Rep* **27**(6): 1779-1786.

Antoon, J. W., M. D. White, E. M. Slaughter, J. L. Driver, H. S. Khalili, S. Elliott, C. D. Smith, M. E. Burow and B. S. Beckman (2011). "Targeting NFkB mediated breast cancer chemoresistance through selective inhibition of sphingosine kinase-2." *Cancer Biol Ther* **11**(7): 678-689.

Apetoh, L., S. Ladoire, G. Coukos and F. Ghiringhelli (2015). "Combining immunotherapy and anticancer agents: the right path to achieve cancer cure?" *Ann Oncol* **26**(9): 1813-1823.

Arora, P., A. Baena, K. O. Yu, N. K. Saini, S. S. Kharkwal, M. F. Goldberg, S. Kunnath-Velayudhan, L. J. Carreno, M. M. Venkataswamy, J. Kim, E. Lazar-Molnar, G. Lauvau, Y. T. Chang, Z. Liu, R. Bittman, A. Al-Shamkhani, L. R. Cox, P. J. Jervis, N. Veerapen, G. S.

B

Besra and S. A. Porcelli (2014). "A single subset of dendritic cells controls the cytokine bias of natural killer T cell responses to diverse glycolipid antigens." *Immunity* **40**(1): 105-116.

Bachmaier, K., E. Guzman, T. Kawamura, X. Gao and A. B. Malik (2012). "Sphingosine kinase 1 mediation of expression of the anaphylatoxin receptor C5L2 dampens the inflammatory response to endotoxin." *PLoS One* **7**(2): e30742.

Bai, A., H. Hu, M. Yeung and J. Chen (2007). "Kruppel-like factor 2 controls T cell trafficking by activating L-selectin (CD62L) and sphingosine-1-phosphate receptor 1 transcription." *J Immunol* **178**(12): 7632-7639.

Bai, A., E. Kokkotou, Y. Zheng and S. C. Robson (2015). "Role of acid sphingomyelinase bioactivity in human CD4+ T-cell activation and immune responses." *Cell Death Dis* **6**: e1828.

Bai, A., A. Moss, E. Kokkotou, A. Usheva, X. Sun, A. Cheifetz, Y. Zheng, M. S. Longhi, W. Gao, Y. Wu and S. C. Robson (2014). "CD39 and CD161 modulate Th17 responses in Crohn's disease." *J Immunol* **193**(7): 3366-3377.

Baker, D. L., T. C. Pham and M. A. Sparks (2013). "Structure and catalytic function of sphingosine kinases: analysis by site-directed mutagenesis and enzyme kinetics." *Biochim Biophys Acta* **1831**(1): 139-146.

Baker, K., J. Lachapelle, I. Zlobec, T. A. Bismar, L. Terracciano and W. D. Foulkes (2011). "Prognostic significance of CD8+ T lymphocytes in breast cancer depends upon both oestrogen receptor status and histological grade." *Histopathology* **58**(7): 1107-1116.

Bankovich, A. J., L. R. Shiow and J. G. Cyster (2010). "CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4." *J Biol Chem* **285**(29): 22328-22337.

Barra, G., A. Lepore, M. Gagliardi, D. Somma, M. R. Matarazzo, F. Costabile, G. Pasquale, A. Mazzoni, C. Gallo, G. Nuzzo, F. Annunziato, A. Fontana, A. Leonardi and R. De Palma (2018). "Sphingosine Kinases promote IL-17 expression in human T lymphocytes." *Sci Rep* **8**(1): 13233.

Bates, G. J., S. B. Fox, C. Han, R. D. Leek, J. F. Garcia, A. L. Harris and A. H. Banham (2006). "Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse." *J Clin Oncol* **24**(34): 5373-5380.

Battula, V. L., Y. Shi, K. W. Evans, R. Y. Wang, E. L. Spaeth, R. O. Jacamo, R. Guerra, A. A. Sahin, F. C. Marini, G. Hortobagyi, S. A. Mani and M. Andreeff (2012). "Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis." *J Clin Invest* **122**(6): 2066-2078.

Bektas, M., M. L. Allende, B. G. Lee, W. Chen, M. J. Amar, A. T. Remaley, J. D. Saba and R. L. Proia (2010). "Sphingosine 1-phosphate lyase deficiency disrupts lipid homeostasis in liver." *J Biol Chem* **285**(14): 10880-10889.

Benechet, A. P., M. Menon, D. Xu, T. Samji, L. Maher, T. T. Murooka, T. R. Mempel, B. S. Sheridan, F. M. Lemoine and K. M. Khanna (2016). "T cell-intrinsic S1PR1 regulates endogenous effector T-cell egress dynamics from lymph nodes during infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**(8): 2182-2187.

Benevides, L., C. R. Cardoso, D. G. Tiezzi, H. R. Marana, J. M. Andrade and J. S. Silva (2013). "Enrichment of regulatory T cells in invasive breast tumor correlates with the upregulation of IL-17A expression and invasiveness of the tumor." *Eur J Immunol* **43**(6): 1518-1528.

Bezombes, C., B. Segui, O. Cuvillier, A. P. Bruno, E. Uro-Coste, V. Gouaze, N. Andrieu-Abadie, S. Carpentier, G. Laurent, R. Salvayre, J. P. Jaffrezou and T. Levade (2001). "Lysosomal sphingomyelinase is not solicited for apoptosis signaling." *FASEB J* **15**(2): 297-299.

Bienias, K., A. Fiedorowicz, A. Sadowska, S. Prokopiuk and H. Car (2016). "Regulation of sphingomyelin metabolism." *Pharmacol Rep* **68**(3): 570-581.

Binder-Foucard, F., Belot, A., Delafosse, P., Remontet, L., Woronoff, A.S., Bossard, N. (2013). Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1 – Tumeurs solides. Saint-Maurice (Fra), Institut de veille sanitaire: 122.

Blaho, V. A. and T. Hla (2014). "An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors." *J Lipid Res* **55**(8): 1596-1608.

Bobowski, M., A. Vincent, A. Steenackers, F. Colomb, I. Van Seuning, S. Julien and P. Delannoy (2013). "Estradiol represses the G(D3) synthase gene ST8SIA1 expression in human breast cancer cells by preventing NFkappaB binding to ST8SIA1 promoter." *PLoS One* **8**(4): e62559.

Bode, C., S. C. Sensken, U. Peest, G. Beutel, F. Thol, B. Levkau, Z. Li, R. Bittman, T. Huang, M. Tolle, M. van der Giet and M. H. Graler (2010). "Erythrocytes serve as a reservoir for cellular and extracellular sphingosine 1-phosphate." *J Cell Biochem* **109**(6): 1232-1243.

Bonnefoi, H., T. Grellety, O. Tredan, M. Saghatchian, F. Dalenc, A. Mailliez, T. L'Haridon, P. Cottu, S. Abadie-Lacourtoisie, B. You, M. Mousseau, J. Dauba, F. Del Piano, I. Desmoulin, F. Coussy, N. Madranges, J. Grenier, F. C. Bidard, C. Proudhon, G. MacGrogan, C. Orsini, M. Pulido and A. Goncalves (2016). "A phase II trial of abiraterone acetate plus prednisone in patients with triple-negative androgen receptor positive locally advanced or metastatic breast cancer (UCBG 12-1)." *Ann Oncol* **27**(5): 812-818.

Bornancin, F. (2011). "Ceramide kinase: the first decade." *Cell Signal* **23**(6): 999-1008.

Bortlein, C., A. Draeger, R. Schoenauer, A. Kuhlemann, M. Sauer, S. Schneider-Schaulies and E. Avota (2018). "The Neutral Sphingomyelinase 2 Is Required to Polarize and Sustain T Cell Receptor Signaling." *Front Immunol* **9**: 815.

Bosio, A., E. Binczek and W. Stoffel (1996). "Molecular cloning and characterization of the mouse CGT gene encoding UDP-galactose ceramide-galactosyltransferase (cerebroside synthetase)." *Genomics* **35**(1): 223-226.

Boucher, L. M., K. Wiegmann, A. Futterer, K. Pfeffer, T. Machleidt, S. Schutze, T. W. Mak and M. Kronke (1995). "CD28 signals through acidic sphingomyelinase." *J Exp Med* **181**(6): 2059-2068.

Boutin, M., P. Lavoie, M. Abaoui and C. Auray-Blais (2016). "Tandem Mass Spectrometry Quantitation of Lyso-Gb3 and Six Related Analogs in Plasma for Fabry Disease Patients." *Curr Protoc Hum Genet* **90**: 17.23.11-19.

Breart, B., W. D. Ramos-Perez, A. Mendoza, A. K. Salous, M. Gobert, Y. Huang, R. H. Adams, J. J. Lafaille, D. Escalante-Alcalde, A. J. Morris and S. R. Schwab (2011). "Lipid phosphate phosphatase 3 enables efficient thymic egress." *J Exp Med* **208**(6): 1267-1278.

Burnet, F. M. (1971). "Immunological surveillance in neoplasia." *Transplant Rev* **7**: 3-25.

Burnet, M. (1957). "Cancer; a biological approach. I. The processes of control." *Br Med J* **1**(5022): 779-786.

Burstein, M. D., A. Tsimelzon, G. M. Poage, K. R. Covington, A. Contreras, S. A. Fuqua, M. I. Savage, C. K. Osborne, S. G. Hilsenbeck, J. C. Chang, G. B. Mills, C. C. Lau and P. H. Brown (2015). "Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer." *Clin Cancer Res* **21**(7): 1688-1698.

C

Cabot, M. C., A. E. Giuliano, A. Volner and T. Y. Han (1996). "Tamoxifen retards glycosphingolipid metabolism in human cancer cells." *FEBS Lett* **394**(2): 129-131.

Cai, L., C. Oyeniran, D. D. Biswas, J. Allegood, S. Milstien, T. Kordula, M. Maceyka and S. Spiegel (2016). "ORMDL proteins regulate ceramide levels during sterile inflammation." *J Lipid Res* **57**(8): 1412-1422.

Cao, Q., X. Chen, X. Wu, R. Liao, P. Huang, Y. Tan, L. Wang, G. Ren, J. Huang and C. Dong (2018). "Inhibition of UGT8 suppresses basal-like breast cancer progression by attenuating sulfatide-alphaVbeta5 axis." *J Exp Med* **215**(6): 1679-1692.

Carlson, C. M., B. T. Endrizzi, J. Wu, X. Ding, M. A. Weinreich, E. R. Walsh, M. A. Wani, J. B. Lingrel, K. A. Hogquist and S. C. Jameson (2006). "Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration." *Nature* **442**(7100): 299-302.

Cazet, A., J. Lefebvre, E. Adriaenssens, S. Julien, M. Bobowski, A. Grigoriadis, A. Tutt, D. Tulasne, X. Le Bourhis and P. Delannoy (2010). "GD(3) synthase expression enhances proliferation and tumor growth of MDA-MB-231 breast cancer cells through c-Met activation." *Mol Cancer Res* **8**(11): 1526-1535.

Chae, S. S., J. H. Paik, H. Furneaux and T. Hla (2004). "Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference." *J Clin Invest* **114**(8): 1082-1089.

Chan, S. Y., A. L. Hilchie, M. G. Brown, R. Anderson and D. W. Hoskin (2007). "Apoptosis induced by intracellular ceramide accumulation in MDA-MB-435 breast carcinoma cells is dependent on the generation of reactive oxygen species." *Exp Mol Pathol* **82**(1): 1-11.

Chapman, J. V., V. Gouaze-Andersson, M. C. Messner, M. Flowers, R. Karimi, M. Kester, B. M. Barth, X. Liu, Y. Y. Liu, A. E. Giuliano and M. C. Cabot (2010). "Metabolism of short-chain ceramide by human cancer cells--implications for therapeutic approaches." *Biochem Pharmacol* **80**(3): 308-315.

Charles, A. G., T. Y. Han, Y. Y. Liu, N. Hansen, A. E. Giuliano and M. C. Cabot (2001). "Taxol-induced ceramide generation and apoptosis in human breast cancer cells." *Cancer Chemother Pharmacol* **47**(5): 444-450.

Che, J., Y. Huang, C. Xu and P. Zhang (2017). "Increased ceramide production sensitizes breast cancer cell response to chemotherapy." *Cancer Chemother Pharmacol* **79**(5): 933-941.

Cheang, M. C., D. Voduc, C. Bajdik, S. Leung, S. McKinney, S. K. Chia, C. M. Perou and T. O. Nielsen (2008). "Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype." *Clin Cancer Res* **14**(5): 1368-1376.

Chen, W. C., Y. H. Lai, H. Y. Chen, H. R. Guo, I. J. Su and H. H. Chen (2013). "Interleukin-17-producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor." *Histopathology* **63**(2): 225-233.

Chiba, K., H. Matsuyuki, Y. Maeda and K. Sugahara (2006). "Role of sphingosine 1-phosphate receptor type 1 in lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus." Cell Mol Immunol **3**(1): 11-19.

Chipuk, J. E., G. P. McStay, A. Bharti, T. Kuwana, C. J. Clarke, L. J. Siskind, L. M. Obeid and D. R. Green (2012). "Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis." Cell **148**(5): 988-1000.

Church, L. D., G. Hessler, J. E. Goodall, D. A. Rider, C. J. Workman, D. A. Vignali, P. A. Bacon, E. Gulbins and S. P. Young (2005). "TNFR1-induced sphingomyelinase activation modulates TCR signaling by impairing store-operated Ca²⁺ influx." J Leukoc Biol **78**(1): 266-278.

Cifone, M. G., R. De Maria, P. Roncaioli, M. R. Rippon, M. Azuma, L. L. Lanier, A. Santoni and R. Testi (1994). "Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase." J Exp Med **180**(4): 1547-1552.

Clarke, C. J., E. A. Cloessner, P. L. Roddy and Y. A. Hannun (2011). "Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) is the primary neutral sphingomyelinase isoform activated by tumour necrosis factor-alpha in MCF-7 cells." Biochem J **435**(2): 381-390.

Coant, N., W. Sakamoto, C. Mao and Y. A. Hannun (2017). "Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease." Adv Biol Regul **63**: 122-131.

Cock, J. G., A. D. Tepper, E. de Vries, W. J. van Blitterswijk and J. Borst (1998). "CD95 (Fas/APO-1) induces ceramide formation and apoptosis in the absence of a functional acid sphingomyelinase." J Biol Chem **273**(13): 7560-7565.

Coley, W. B. (1910). "The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus)." Proc R Soc Med **3**(Surg Sect): 1-48.

Collenburg, L., N. Beyersdorf, T. Wiese, C. Arenz, E. M. Saied, K. A. Becker-Flegler, S. Schneider-Schaulies and E. Avota (2017). "The Activity of the Neutral Sphingomyelinase Is Important in T Cell Recruitment and Directional Migration." Front Immunol **8**: 1007.

Contesso, G. and J. Y. Petit (1979). "[Non-infiltrating intraductal carcinoma of the breast (author's transl)]." Bull Cancer **66**(1): 1-8.

Contreras, F. X., G. Basanez, A. Alonso, A. Herrmann and F. M. Goni (2005). "Asymmetric addition of ceramides but not dihydroceramides promotes transbilayer (flip-flop) lipid motion in membranes." Biophys J **88**(1): 348-359.

Coskun, U., M. Grzybek, D. Drechsel and K. Simons (2011). "Regulation of human EGF receptor by lipids." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(22): 9044-9048.

Cremesti, A., F. Paris, H. Grassme, N. Holler, J. Tschopp, Z. Fuks, E. Gulbins and R. Kolesnick (2001). "Ceramide enables fas to cap and kill." J Biol Chem **276**(26): 23954-23961.

Criscitiello, C. (2012). "Tumor-associated antigens in breast cancer." Breast Care (Basel) **7**(4): 262-266.

Culhane, A. C. and J. Quackenbush (2009). "Confounding effects in "A six-gene signature predicting breast cancer lung metastasis"." Cancer Res **69**(18): 7480-7485.

Curigliano, G., H. J. Burstein, P. W. E. M. Gnant, P. Dubsy, S. Loibl, M. Colleoni, M. M. Regan, M. Piccart-Gebhart, H. J. Senn, B. Thurlimann, C. St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast, F. Andre, J. Baselga, J. Bergh, H. Bonnefoi, Y. B. S, F. Cardoso, L. Carey, E. Ciruelos, J. Cuzick, C. Denkert, A. Di Leo, B. Ejlertsen, P. Francis, V. Galimberti, J. Garber, B. Gulluoglu, P. Goodwin, N. Harbeck, D. F. Hayes, C. S. Huang, J. Huober, K. Hussein, J. Jassem, Z. Jiang, P. Karlsson, M. Morrow, R. Orecchia, K. C. Osborne, O. Pagani, A. H. Partridge, K. Pritchard, J. Ro, E. J. T. Rutgers, F. Sedlmayer, V. Semiglazov, Z. Shao, I. Smith, M. Toi, A. Tutt, G. Viale, T. Watanabe, T. J. Whelan and B. Xu (2017). "De-escalating and escalating treatments for early-stage breast

cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017." *Ann Oncol* **28**(8): 1700-1712.

Cuvillier, O., G. Pirianov, B. Kleuser, P. G. Vanek, O. A. Coso, S. Gutkind and S. Spiegel (1996). "Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate." *Nature* **381**(6585): 800-803.

D'Angelo, G., E. Polishchuk, G. Di Tullio, M. Santoro, A. Di Campli, A. Godi, G. West, J. Bielawski, C. C. Chuang, A. C. van der Spoel, F. M. Platt, Y. A. Hannun, R. Polishchuk, P. Mattjus and M. A. De Matteis (2007). "Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide." *Nature* **449**(7158): 62-67.

Datta, A., S. Y. Loo, B. Huang, L. Wong, S. S. Tan, T. Z. Tan, S. C. Lee, J. P. Thiery, Y. C. Lim, W. P. Yong, Y. Lam, A. P. Kumar and C. T. Yap (2014). "SPHK1 regulates proliferation and survival responses in triple-negative breast cancer." *Oncotarget* **5**(15): 5920-5933.

D

Datta, J., E. Berk, S. Xu, E. Fitzpatrick, C. Rosembly, L. Lowenfeld, N. Goodman, D. A. Lewis, P. J. Zhang, C. Fisher, R. E. Roses, A. DeMichele and B. J. Czerniecki (2015). "Anti-HER2 CD4(+) T-helper type 1 response is a novel immune correlate to pathologic response following neoadjuvant therapy in HER2-positive breast cancer." *Breast Cancer Res* **17**: 71.

DeNardo, D. G., J. B. Barreto, P. Andreu, L. Vasquez, D. Tawfik, N. Kolhatkar and L. M. Coussens (2009). "CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages." *Cancer Cell* **16**(2): 91-102.

DeNardo, D. G., D. J. Brennan, E. Rexhepaj, B. Ruffell, S. L. Shiao, S. F. Madden, W. M. Gallagher, N. Wadhvani, S. D. Keil, S. A. Junaid, H. S. Rugo, E. S. Hwang, K. Jirstrom, B. L. West and L. M. Coussens (2011). "Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy." *Cancer Discov* **1**(1): 54-67.

Denkert, C., S. Loibl, A. Noske, M. Roller, B. M. Muller, M. Komor, J. Budczies, S. Darb-Esfahani, R. Kronenwett, C. Hanusch, C. von Torne, W. Weichert, K. Engels, C. Solbach, I. Schrader, M. Dietel and G. von Minckwitz (2010). "Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer." *J Clin Oncol* **28**(1): 105-113.

Denkert, C., G. von Minckwitz, S. Darb-Esfahani, B. Lederer, B. I. Heppner, K. E. Weber, J. Budczies, J. Huober, F. Klauschen, J. Furlanetto, W. D. Schmitt, J. U. Blohmer, T. Karn, B. M. Pfitzner, S. Kummel, K. Engels, A. Schneeweiss, A. Hartmann, A. Noske, P. A. Fasching, C. Jackisch, M. van Mackelenbergh, P. Sinn, C. Schem, C. Hanusch, M. Untch and S. Loibl (2018). "Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy." *Lancet Oncol* **19**(1): 40-50.

Denkert, C., S. Wienert, A. Poterie, S. Loibl, J. Budczies, S. Badve, Z. Bago-Horvath, A. Bane, S. Bedri, J. Brock, E. Chmielik, M. Christgen, C. Colpaert, S. Demaria, G. Van den Eynden, G. Floris, S. B. Fox, D. Gao, B. Ingold Heppner, S. R. Kim, Z. Kos, H. H. Kreipe, S. R. Lakhani, F. Penault-Llorca, G. Pruneri, N. Radosevic-Robin, D. L. Rimm, S. J. Schnitt, B. V. Sinn, P. Sinn, N. Sirtaine, S. A. O'Toole, G. Viale, K. Van de Vijver, R. de Wind, G. von Minckwitz, F. Klauschen, M. Untch, P. A. Fasching, T. Reimer, K. Willard-Gallo, S. Michiels, S. Loi and R. Salgado (2016). "Standardized evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: results of the ring studies of the international immuno-oncology biomarker working group." *Mod Pathol* **29**(10): 1155-1164.

Detre, C., E. Kiss, Z. Varga, K. Ludanyi, K. Paszty, A. Enyedi, D. Kovetsdi, G. Panyi, E. Rajnavolgyi and J. Matko (2006). "Death or survival: membrane ceramide controls the fate

and activation of antigen-specific T-cells depending on signal strength and duration." *Cell Signal* **18**(3): 294-306.

Dieci, M. V., C. Criscitiello, A. Goubar, G. Viale, P. Conte, V. Guarneri, G. Ficarra, M. C. Mathieu, S. Delaloge, G. Curigliano and F. Andre (2015). "Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study." *Ann Oncol* **26**(7): 1518.

Dieci, M. V., M. C. Mathieu, V. Guarneri, P. Conte, S. Delaloge, F. Andre and A. Goubar (2015). "Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials." *Ann Oncol* **26**(8): 1698-1704.

Dirix, L. Y., I. Takacs, G. Jerusalem, P. Nikolinakos, H. T. Arkenau, A. Forero-Torres, R. Boccia, M. E. Lippman, R. Somer, M. Smakal, L. A. Emens, B. Hrinchenko, W. Edenfield, J. Gurtler, A. von Heydebreck, H. J. Grote, K. Chin and E. P. Hamilton (2018). "Avelumab, an anti-PD-L1 antibody, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer: a phase 1b JAVELIN Solid Tumor study." *Breast Cancer Res Treat* **167**(3): 671-686.

Do, S. I., H. S. Kim, K. Kim, H. Lee, I. G. Do, D. H. Kim, S. W. Chae and J. H. Sohn (2017). "Predictive and prognostic value of sphingosine kinase 1 expression in patients with invasive ductal carcinoma of the breast." *Am J Transl Res* **9**(12): 5684-5695.

Don, A. S., X. Y. Lim and T. A. Couttas (2014). "Re-configuration of sphingolipid metabolism by oncogenic transformation." *Biomolecules* **4**(1): 315-353.

Dong, L., K. Watanabe, M. Itoh, C. R. Huan, X. P. Tong, T. Nakamura, M. Miki, H. Iwao, A. Nakajima, T. Sakai, T. Kawanami, T. Sawaki, Y. Masaki, T. Fukushima, Y. Fujita, M. Tanaka, M. Yano, T. Okazaki and H. Umehara (2012). "CD4+ T-cell dysfunctions through the impaired lipid rafts ameliorate concanavalin A-induced hepatitis in sphingomyelin synthase 1-knockout mice." *Int Immunol* **24**(5): 327-337.

Donoviel, M. S., N. C. Hait, S. Ramachandran, M. Maceyka, K. Takabe, S. Milstien, T. Oravec and S. Spiegel (2015). "Spinster 2, a sphingosine-1-phosphate transporter, plays a critical role in inflammatory and autoimmune diseases." *FASEB J* **29**(12): 5018-5028.

Drouillard, A., A. Neyra, A. L. Mathieu, A. Marcais, M. Wencker, J. Marvel, A. Belot and T. Walzer (2018). "Human Naive and Memory T Cells Display Opposite Migratory Responses to Sphingosine-1 Phosphate." *J Immunol* **200**(2): 551-557.

Du, W., N. Takuwa, K. Yoshioka, Y. Okamoto, K. Gonda, K. Sugihara, A. Fukamizu, M. Asano and Y. Takuwa (2010). "S1P(2), the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, negatively regulates tumor angiogenesis and tumor growth in vivo in mice." *Cancer Res* **70**(2): 772-781.

Dumitru, C. A. and E. Gulbins (2006). "TRAIL activates acid sphingomyelinase via a redox mechanism and releases ceramide to trigger apoptosis." *Oncogene* **25**(41): 5612-5625.

Dunn, G. P., L. J. Old and R. D. Schreiber (2004). "The three Es of cancer immunoediting." *Annu Rev Immunol* **22**: 329-360.

Duran, J. M., F. Campelo, J. van Galen, T. Sachsenheimer, J. Sot, M. V. Egorov, C. Rentero, C. Enrich, R. S. Polishchuk, F. M. Goni, B. Brugger, F. Wieland and V. Malhotra (2012). "Sphingomyelin organization is required for vesicle biogenesis at the Golgi complex." *EMBO J* **31**(24): 4535-4546.

Dziegiel, P., T. Owczarek, E. Plazuk, A. Gomulkiewicz, M. Majchrzak, M. Podhorska-Okolow, K. Driouch, R. Lidereau and M. Ugorski (2010). "Ceramide galactosyltransferase (UGT8) is a molecular marker of breast cancer malignancy and lung metastases." *Br J Cancer* **103**(4): 524-531.

E

Edmond, V., F. Dufour, G. Poiroux, K. Shoji, M. Malleter, A. Fouque, S. Tauzin, R. Rimokh, O. Sergent, A. Penna, A. Dupuy, T. Levade, N. Theret, O. Micheau, B. Segui and P.

Legembre (2015). "Downregulation of ceramide synthase-6 during epithelial-to-mesenchymal transition reduces plasma membrane fluidity and cancer cell motility." *Oncogene* **34**(8): 996-1005.

Eken, A., R. Duhon, A. K. Singh, M. Fry, J. H. Buckner, M. Kita, E. Bettelli and M. Oukka (2017). "S1P1 deletion differentially affects TH17 and Regulatory T cells." *Sci Rep* **7**(1): 12905.

Ellegaard, A. M., L. Groth-Pedersen, V. Oorschot, J. Klumperman, T. Kirkegaard, J. Nylandsted and M. Jaattela (2013). "Sunitinib and SU11652 inhibit acid sphingomyelinase, destabilize lysosomes, and inhibit multidrug resistance." *Mol Cancer Ther* **12**(10): 2018-2030.

Engel, N., A. Adamus, M. Frank, K. Kraft, J. Kuhn, P. Muller, B. Nebe, A. Kasten and G. Seitz (2018). "First evidence of SGPL1 expression in the cell membrane silencing the extracellular S1P siren in mammary epithelial cells." *PLoS One* **13**(5): e0196854.

Erez-Roman, R., R. Pienik and A. H. Futerman (2010). "Increased ceramide synthase 2 and 6 mRNA levels in breast cancer tissues and correlation with sphingosine kinase expression." *Biochem Biophys Res Commun* **391**(1): 219-223.

Eryilmaz, M. K., H. Mutlu, B. Unal, D. K. Salim, F. Y. Musri and H. S. Coskun (2018). "The importance of stromal and intratumoral tumor lymphocyte infiltration for pathologic complete response in patients with locally advanced breast cancer." *J Cancer Res Ther* **14**(3): 619-624.

Escriva-de-Romani, S., M. Arumi, M. Bellet and C. Saura (2018). "HER2-positive breast cancer: Current and new therapeutic strategies." *Breast* **39**: 80-88.

Espinoza, J. A., S. Jabeen, R. Batra, E. Papaleo, V. Haakensen, V. Timmermans Wielenga, M. L. Moller Talman, N. Brunner, A. L. Borresen-Dale, P. Gromov, A. Helland, V. N. Kristensen and I. Gromova (2016). "Cytokine profiling of tumor interstitial fluid of the breast and its relationship with lymphocyte infiltration and clinicopathological characteristics." *Oncoimmunology* **5**(12): e1248015.

Exley, M. A., P. Friedlander, N. Alatrakchi, L. Vriend, S. Yue, T. Sasada, W. Zeng, Y. Mizukami, J. Clark, D. Nemer, K. LeClair, C. Canning, H. Daley, G. Dranoff, A. Giobbie-Hurder, F. S. Hodi, J. Ritz and S. P. Balk (2017). "Adoptive Transfer of Invariant NKT Cells as Immunotherapy for Advanced Melanoma: A Phase I Clinical Trial." *Clin Cancer Res* **23**(14): 3510-3519.

F

Faverly, D. R., L. Burgers, P. Bult and R. Holland (1994). "Three dimensional imaging of mammary ductal carcinoma in situ: clinical implications." *Semin Diagn Pathol* **11**(3): 193-198.

Feng, L. X., M. Li, Y. J. Liu, S. M. Yang and N. Zhang (2014). "Synergistic enhancement of cancer therapy using a combination of ceramide and docetaxel." *Int J Mol Sci* **15**(3): 4201-4220.

Feng, Y. H., W. Y. Chen, Y. H. Kuo, C. L. Tung, C. J. Tsao, A. L. Shiau and C. L. Wu (2016). "Elovl6 is a poor prognostic predictor in breast cancer." *Oncol Lett* **12**(1): 207-212.

Ferreira, N. S., H. Engelsby, D. Neess, S. L. Kelly, G. Volpert, A. H. Merrill, A. H. Futerman and N. J. Faergeman (2017). "Regulation of very-long acyl chain ceramide synthesis by acyl-CoA-binding protein." *J Biol Chem* **292**(18): 7588-7597.

Filipenko, I., S. Schwalm, L. Reali, J. Pfeilschifter, D. Fabbro, A. Huwiler and U. Zangemeister-Wittke (2016). "Upregulation of the S1P3 receptor in metastatic breast cancer cells increases migration and invasion by induction of PGE2 and EP2/EP4 activation." *Biochim Biophys Acta* **1861**(11): 1840-1851.

Flowers, M., G. Fabrias, A. Delgado, J. Casas, J. L. Abad and M. C. Cabot (2012). "C6-ceramide and targeted inhibition of acid ceramidase induce synergistic decreases in breast cancer cell growth." *Breast Cancer Res Treat* **133**(2): 447-458.

Foley, E. J. (1953). "Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin." *Cancer Res* **13**(12): 835-837.

Fridman, W. H., F. Pages, C. Sautes-Fridman and J. Galon (2012). "The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome." *Nat Rev Cancer* **12**(4): 298-306.

Fuentes, D., J. Avellanet, A. Garcia, N. Iglesias, M. R. Gabri, D. F. Alonso, A. M. Vazquez, R. Perez and E. Montero (2010). "Combined therapeutic effect of a monoclonal anti-idiotypic tumor vaccine against NeuGc-containing gangliosides with chemotherapy in a breast carcinoma model." *Breast Cancer Res Treat* **120**(2): 379-389.

Fujii, K., T. Machida, K. Iizuka and M. Hirafuji (2014). "Sphingosine 1-phosphate increases an intracellular Ca(2+) concentration via S1P3 receptor in cultured vascular smooth muscle cells." *J Pharm Pharmacol* **66**(6): 802-810.

Fukuhara, S., S. Simmons, S. Kawamura, A. Inoue, Y. Orba, T. Tokudome, Y. Sunden, Y. Arai, K. Moriwaki, J. Ishida, A. Uemura, H. Kiyonari, T. Abe, A. Fukamizu, M. Hirashima, H. Sawa, J. Aoki, M. Ishii and N. Mochizuki (2012). "The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice." *J Clin Invest* **122**(4): 1416-1426.

Funato, K. and H. Riezman (2001). "Vesicular and nonvesicular transport of ceramide from ER to the Golgi apparatus in yeast." *J Cell Biol* **155**(6): 949-959.

Futerman, A. H. and Y. A. Hannun (2004). "The complex life of simple sphingolipids." *EMBO Rep* **5**(8): 777-782.

G

Gabai-Kapara, E., A. Lahad, B. Kaufman, E. Friedman, S. Segev, P. Renbaum, R. Beeri, M. Gal, J. Grinshpun-Cohen, K. Djemal, J. B. Mandell, M. K. Lee, U. Beller, R. Catane, M. C. King and E. Levy-Lahad (2014). "Population-based screening for breast and ovarian cancer risk due to BRCA1 and BRCA2." *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Gagliostro, V., J. Casas, A. Caretti, J. L. Abad, L. Tagliavacca, R. Ghidoni, G. Fabrias and P. Signorelli (2012). "Dihydroceramide delays cell cycle G1/S transition via activation of ER stress and induction of autophagy." *Int J Biochem Cell Biol* **44**(12): 2135-2143.

Galluzzi, L., A. Buque, O. Kepp, L. Zitvogel and G. Kroemer (2015). "Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents." *Cancer Cell* **28**(6): 690-714.

Galluzzi, L., A. Buque, O. Kepp, L. Zitvogel and G. Kroemer (2017). "Immunogenic cell death in cancer and infectious disease." *Nat Rev Immunol* **17**(2): 97-111.

Garaud, S., C. Gu-Trantien, J. N. Lodewyckx, A. Boisson, P. De Silva, L. Buisseret, E. Migliori, M. Libin, C. Naveaux, H. Duvillier and K. Willard-Gallo (2014). "A simple and rapid protocol to non-enzymatically dissociate fresh human tissues for the analysis of infiltrating lymphocytes." *J Vis Exp*(94).

Garcia-Arribas, A. B., A. Alonso and F. M. Goni (2016). "Cholesterol interactions with ceramide and sphingomyelin." *Chem Phys Lipids* **199**: 26-34.

Gargett, T., W. Yu, G. Dotti, E. S. Yvon, S. N. Christo, J. D. Hayball, I. D. Lewis, M. K. Brenner and M. P. Brown (2016). "GD2-specific CAR T Cells Undergo Potent Activation and Deletion Following Antigen Encounter but can be Protected From Activation-induced Cell Death by PD-1 Blockade." *Mol Ther* **24**(6): 1135-1149.

Garris, C. S., V. A. Blaho, T. Hla and M. H. Han (2014). "Sphingosine-1-phosphate receptor 1 signalling in T cells: trafficking and beyond." *Immunology* **142**(3): 347-353.

Garris, C. S., L. Wu, S. Acharya, A. Arac, V. A. Blaho, Y. Huang, B. S. Moon, R. C. Axtell, P. P. Ho, G. K. Steinberg, D. B. Lewis, R. A. Sobel, D. K. Han, L. Steinman, M. P. Snyder, T. Hla and M. H. Han (2013). "Defective sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1)

phosphorylation exacerbates TH17-mediated autoimmune neuroinflammation." Nat Immunol **14**(11): 1166-1172.

Gebremeskel, S., L. Lobert, K. Tanner, B. Walker, T. Oliphant, L. E. Clarke, G. Dellaire and B. Johnston (2017). "Natural Killer T-cell Immunotherapy in Combination with Chemotherapy-Induced Immunogenic Cell Death Targets Metastatic Breast Cancer." Cancer Immunol Res **5**(12): 1086-1097.

Ghirelli, C., F. Reyat, M. Jeanmougin, R. Zollinger, P. Sirven, P. Michea, C. Caux, N. Bendriss-Vermare, M. H. Donnadieu, M. Caly, V. Fourchette, A. Vincent-Salomon, B. Sigal-Zafrani, X. Sastre-Garau and V. Soumelis (2015). "Breast Cancer Cell-Derived GM-CSF Licenses Regulatory Th2 Induction by Plasmacytoid Predendritic Cells in Aggressive Disease Subtypes." Cancer Res **75**(14): 2775-2787.

Giuliano, A. E., J. L. Connolly, S. B. Edge, E. A. Mittendorf, H. S. Rugo, L. J. Solin, D. L. Weaver, D. J. Winchester and G. N. Hortobagyi (2017). "Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual." CA Cancer J Clin **67**(4): 290-303.

Gobert, M., I. Treilleux, N. Bendriss-Vermare, T. Bachelot, S. Goddard-Leon, V. Arfi, C. Biota, A. C. Doffin, I. Durand, D. Olive, S. Perez, N. Pasqual, C. Faure, I. Ray-Coquard, A. Puisieux, C. Caux, J. Y. Blay and C. Menetrier-Caux (2009). "Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome." Cancer Res **69**(5): 2000-2009.

Goldhirsch, A., E. P. Winer, A. S. Coates, R. D. Gelber, M. Piccart-Gebhart, B. Thurlimann, H. J. Senn and m. Panel (2013). "Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013." Ann Oncol **24**(9): 2206-2223.

Goldhirsch, A., W. C. Wood, A. S. Coates, R. D. Gelber, B. Thurlimann, H. J. Senn and m. Panel (2011). "Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011." Ann Oncol **22**(8): 1736-1747.

Golfier, S., S. Kondo, T. Schulze, T. Takeuchi, G. Vassileva, A. H. Achtman, M. H. Graler, S. J. Abbondanzo, M. Wiekowski, E. Kremmer, Y. Endo, S. A. Lira, K. B. Bacon and M. Lipp (2010). "Shaping of terminal megakaryocyte differentiation and proplatelet development by sphingosine-1-phosphate receptor S1P4." FASEB J **24**(12): 4701-4710.

Gouaze, V., Y. Y. Liu, C. S. Prickett, J. Y. Yu, A. E. Giuliano and M. C. Cabot (2005). "Glucosylceramide synthase blockade down-regulates P-glycoprotein and resensitizes multidrug-resistant breast cancer cells to anticancer drugs." Cancer Res **65**(9): 3861-3867.

Graler, M. H., G. Bernhardt and M. Lipp (1998). "EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue." Genomics **53**(2): 164-169.

Graler, M. H., R. Grosse, A. Kusch, E. Kremmer, T. Gudermann and M. Lipp (2003). "The sphingosine 1-phosphate receptor S1P4 regulates cell shape and motility via coupling to Gi and G12/13." J Cell Biochem **89**(3): 507-519.

Grassme, H., V. Jendrossek, J. Bock, A. Riehle and E. Gulbins (2002). "Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering." J Immunol **168**(1): 298-307.

Grin'kina, N. M., E. E. Karnabi, D. Damania, S. Wadgaonkar, I. A. Muslimov and R. Wadgaonkar (2012). "Sphingosine kinase 1 deficiency exacerbates LPS-induced neuroinflammation." PLoS One **7**(5): e36475.

Gross, L. (1943). "Intradermal Immunization of C3H Mice against a Sarcoma That Originated in an Animal of the Same Line." Cancer Research **3**(5): 326-333.

Groux-Degroote, S., Y. Guerardel and P. Delannoy (2017). "Gangliosides: Structures, Biosynthesis, Analysis, and Roles in Cancer." ChemBiochem **18**(13): 1146-1154.

Gu-Trantien, C., S. Loi, S. Garaud, C. Equeter, M. Libin, A. de Wind, M. Ravoet, H. Le Buanec, C. Sibille, G. Manfouo-Foutsop, I. Veys, B. Haibe-Kains, S. K. Singhal, S. Michiels, F. Rothe, R. Salgado, H. Duvillier, M. Ignatiadis, C. Desmedt, D. Bron, D. Larsimont, M. Piccart, C. Sotiriou and K. Willard-Gallo (2013). "CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival." *J Clin Invest* **123**(7): 2873-2892.

Guillou, H., D. Zdravcevic, P. G. Martin and A. Jacobsson (2010). "The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice." *Prog Lipid Res* **49**(2): 186-199.

H

Hait, N. C., J. Allegood, M. Maceyka, G. M. Strub, K. B. Harikumar, S. K. Singh, C. Luo, R. Marmorstein, T. Kordula, S. Milstien and S. Spiegel (2009). "Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate." *Science* **325**(5945): 1254-1257.

Hait, N. C., D. Avni, A. Yamada, M. Nagahashi, T. Aoyagi, H. Aoki, C. I. Dumur, Z. Zelenko, E. J. Gallagher, D. Leroith, S. Milstien, K. Takabe and S. Spiegel (2015). "The phosphorylated prodrug FTY720 is a histone deacetylase inhibitor that reactivates ERalpha expression and enhances hormonal therapy for breast cancer." *Oncogenesis* **4**: e156.

Hait, N. C., S. Sarkar, H. Le Stunff, A. Mikami, M. Maceyka, S. Milstien and S. Spiegel (2005). "Role of sphingosine kinase 2 in cell migration toward epidermal growth factor." *J Biol Chem* **280**(33): 29462-29469.

Hanada, K., K. Kumagai, S. Yasuda, Y. Miura, M. Kawano, M. Fukasawa and M. Nishijima (2003). "Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide." *Nature* **426**(6968): 803-809.

Hanson, M. A., C. B. Roth, E. Jo, M. T. Griffith, F. L. Scott, G. Reinhart, H. Desale, B. Clemons, S. M. Cahalan, S. C. Schuerer, M. G. Sanna, G. W. Han, P. Kuhn, H. Rosen and R. C. Stevens (2012). "Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor." *Science* **335**(6070): 851-855.

Harris, G. L., M. B. Creason, G. B. Brulte and D. R. Herr (2012). "In vitro and in vivo antagonism of a G protein-coupled receptor (S1P3) with a novel blocking monoclonal antibody." *PLoS One* **7**(4): e35129.

Hartmann, D., J. Lucks, S. Fuchs, S. Schiffmann, Y. Schreiber, N. Ferreiros, J. Merkens, R. Marschalek, G. Geisslinger and S. Grosch (2012). "Long chain ceramides and very long chain ceramides have opposite effects on human breast and colon cancer cell growth." *Int J Biochem Cell Biol* **44**(4): 620-628.

HAS. (2010). "Guide ALD n°30-Cancer du sein." from http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2010-02/ald_30_gm_ksein_vd.pdf.

Heery, C. R., N. K. Ibrahim, P. M. Arlen, M. Mohebtash, J. L. Murray, K. Koenig, R. A. Madan, S. McMahon, J. L. Marte, S. M. Steinberg, R. N. Donahue, I. Grenga, C. Jochems, B. Farsaci, L. R. Folio, J. Schlom and J. L. Gulley (2015). "Docetaxel Alone or in Combination With a Therapeutic Cancer Vaccine (PANVAC) in Patients With Metastatic Breast Cancer: A Randomized Clinical Trial." *JAMA Oncol* **1**(8): 1087-1095.

Helke, K., P. Angel, P. Lu, E. Garrett-Mayer, B. Ogretmen, R. Drake and C. Voelkel-Johnson (2018). "Ceramide Synthase 6 Deficiency Enhances Inflammation in the DSS model of Colitis." *Sci Rep* **8**(1): 1627.

Henning, A. N., R. Roychoudhuri and N. P. Restifo (2018). "Epigenetic control of CD8(+) T cell differentiation." *Nat Rev Immunol* **18**(5): 340-356.

Hensbergen, P. J., P. G. Wijnands, M. W. Schreurs, R. J. Scheper, R. Willemze and C. P. Tensen (2005). "The CXCR3 targeting chemokine CXCL11 has potent antitumor activity in vivo involving attraction of CD8+ T lymphocytes but not inhibition of angiogenesis." *J Immunother* **28**(4): 343-351.

Hernandez-Tiedra, S., G. Fabrias, D. Davila, I. J. Salanueva, J. Casas, L. R. Montes, Z. Anton, E. Garcia-Taboada, M. Salazar-Roa, M. Lorente, J. Nylandsted, J. Armstrong, I. Lopez-Valero, C. S. McKee, A. Serrano-Puebla, R. Garcia-Lopez, J. Gonzalez-Martinez, J. L. Abad, K. Hanada, P. Boya, F. Goni, M. Guzman, P. Lovat, M. Jaattela, A. Alonso and G. Velasco (2016). "Dihydroceramide accumulation mediates cytotoxic autophagy of cancer cells via autolysosome destabilization." *Autophagy* **12**(11): 2213-2229.

Herz, J., J. Pardo, H. Kashkar, M. Schramm, E. Kuzmenkina, E. Bos, K. Wiegmann, R. Wallich, P. J. Peters, S. Herzig, E. Schmelzer, M. Kronke, M. M. Simon and O. Utermohlen (2009). "Acid sphingomyelinase is a key regulator of cytotoxic granule secretion by primary T lymphocytes." *Nat Immunol* **10**(7): 761-768.

Hindley, J. P., E. Jones, K. Smart, H. Bridgeman, S. N. Lauder, B. Ondondo, S. Cutting, K. Ladell, K. K. Wynn, D. Withers, D. A. Price, A. Ager, A. J. Godkin and A. M. Gallimore (2012). "T-cell trafficking facilitated by high endothelial venules is required for tumor control after regulatory T-cell depletion." *Cancer Res* **72**(21): 5473-5482.

Hirata, N., S. Yamada, T. Shoda, M. Kurihara, Y. Sekino and Y. Kanda (2014). "Sphingosine-1-phosphate promotes expansion of cancer stem cells via S1PR3 by a ligand-independent Notch activation." *Nat Commun* **5**: 4806.

Hollmann, C., S. Werner, E. Avota, D. Reuter, L. Japtok, B. Kleuser, E. Gulbins, K. A. Becker, J. Schneider-Schaulies and N. Beyersdorf (2016). "Inhibition of Acid Sphingomyelinase Allows for Selective Targeting of CD4+ Conventional versus Foxp3+ Regulatory T Cells." *J Immunol* **197**(8): 3130-3141.

Honke, K., M. Tsuda, Y. Hirahara, A. Ishii, A. Makita and Y. Wada (1997). "Molecular cloning and expression of cDNA encoding human 3'-phosphoadenylylsulfate:galactosylceramide 3'-sulfotransferase." *J Biol Chem* **272**(8): 4864-4868.

Hornemann, T., A. Penno, M. F. Rutti, D. Ernst, F. Kivrak-Pfiffner, L. Rohrer and A. von Eckardstein (2009). "The SPTLC3 subunit of serine palmitoyltransferase generates short chain sphingoid bases." *J Biol Chem* **284**(39): 26322-26330.

Huitema, K., J. van den Dikkenberg, J. F. Brouwers and J. C. Holthuis (2004). "Identification of a family of animal sphingomyelin synthases." *EMBO J* **23**(1): 33-44.

Ibrahim, N. K., J. L. Murray, D. Zhou, E. A. Mittendorf, D. Sample, M. Tautchin and D. Miles (2013). "Survival Advantage in Patients with Metastatic Breast Cancer Receiving Endocrine Therapy plus Sialyl Tn-KLH Vaccine: Post Hoc Analysis of a Large Randomized Trial." *J Cancer* **4**(7): 577-584.

I

Ichikawa, S., H. Sakiyama, G. Suzuki, K. I. Hidari and Y. Hirabayashi (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**(10): 4638-4643.

Inoki, I., N. Takuwa, N. Sugimoto, K. Yoshioka, S. Takata, S. Kaneko and Y. Takuwa (2006). "Negative regulation of endothelial morphogenesis and angiogenesis by S1P2 receptor." *Biochem Biophys Res Commun* **346**(1): 293-300.

Ito, H., M. Murakami, A. Furuhashi, S. Gao, K. Yoshida, S. Sobue, K. Hagiwara, A. Takagi, T. Kojima, M. Suzuki, Y. Banno, K. Tanaka, K. Tamiya-Koizumi, M. Kyogashima, Y. Nozawa and T. Murate (2009). "Transcriptional regulation of neutral sphingomyelinase 2 gene expression of a human breast cancer cell line, MCF-7, induced by the anti-cancer drug, daunorubicin." *Biochim Biophys Acta* **1789**(11-12): 681-690.

J

- Jaigirdar, S. A., R. A. Benson, A. Elmesmari, M. S. Kurowska-Stolarska, I. B. McInnes, P. Garside and M. K. L. MacLeod (2017). "Sphingosine-1-Phosphate Promotes the Persistence of Activated CD4 T Cells in Inflamed Sites." Front Immunol **8**: 1627.
- Jaillard, C., S. Harrison, B. Stankoff, M. S. Aigrot, A. R. Calver, G. Duddy, F. S. Walsh, M. N. Pangalos, N. Arimura, K. Kaibuchi, B. Zalc and C. Lubetzki (2005). "Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival." J Neurosci **25**(6): 1459-1469.
- Jayadev, S., B. Liu, A. E. Bielawska, J. Y. Lee, F. Nazaire, M. Pushkareva, L. M. Obeid and Y. A. Hannun (1995). "Role for ceramide in cell cycle arrest." J Biol Chem **270**(5): 2047-2052.
- Jennemann, R., M. Rabionet, K. Gorgas, S. Epstein, A. Dalpke, U. Rothermel, A. Bayerle, F. van der Hoeven, S. Imgrund, J. Kirsch, W. Nickel, K. Willecke, H. Riezman, H. J. Grone and R. Sandhoff (2012). "Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption." Hum Mol Genet **21**(3): 586-608.
- Jezequel, P., M. Campone, W. Gouraud, C. Guerin-Charbonnel, C. Leux, G. Ricolleau and L. Champion (2012). "bc-GenExMiner: an easy-to-use online platform for gene prognostic analyses in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **131**(3): 765-775.
- Jezequel, P., D. Loussouarn, C. Guerin-Charbonnel, L. Champion, A. Vanier, W. Gouraud, H. Lasla, C. Guette, I. Valo, V. Verrielle and M. Campone (2015). "Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response." Breast Cancer Res **17**: 43.
- Jin, Y., E. Knudsen, L. Wang, Y. Bryceson, B. Damaj, S. Gessani and A. A. Maghazachi (2003). "Sphingosine 1-phosphate is a novel inhibitor of T-cell proliferation." Blood **101**(12): 4909-4915.
- Jin, Z. X., C. R. Huang, L. Dong, S. Goda, T. Kawanami, T. Sawaki, T. Sakai, X. P. Tong, Y. Masaki, T. Fukushima, M. Tanaka, T. Mimori, H. Tojo, E. T. Bloom, T. Okazaki and H. Umehara (2008). "Impaired TCR signaling through dysfunction of lipid rafts in sphingomyelin synthase 1 (SMS1)-knockdown T cells." Int Immunol **20**(11): 1427-1437.
- Johnson, K. R., K. P. Becker, M. M. Facchinetti, Y. A. Hannun and L. M. Obeid (2002). "PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. Extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)." J Biol Chem **277**(38): 35257-35262.
- Jung, M., B. Oren, J. Mora, C. Mertens, S. Dziumbila, R. Popp, A. Weigert, N. Grossmann, I. Fleming and B. Brune (2016). "Lipocalin 2 from macrophages stimulated by tumor cell-derived sphingosine 1-phosphate promotes lymphangiogenesis and tumor metastasis." Sci Signal **9**(434): ra64.

K

- Kaewkangsadan, V., C. Verma, J. M. Eremin, G. Cowley, M. Ilyas and O. Eremin (2016). "Crucial Contributions by T Lymphocytes (Effector, Regulatory, and Checkpoint Inhibitor) and Cytokines (TH1, TH2, and TH17) to a Pathological Complete Response Induced by Neoadjuvant Chemotherapy in Women with Breast Cancer." J Immunol Res **2016**: 4757405.
- Katsuta, E., L. Yan, M. Nagahashi, A. Raza, J. L. Sturgill, D. E. Lyon, O. M. Rashid, N. C. Hait and K. Takabe (2017). "Doxorubicin effect is enhanced by sphingosine-1-phosphate signaling antagonist in breast cancer." J Surg Res **219**: 202-213.
- Kawahara, A., T. Nishi, Y. Hisano, H. Fukui, A. Yamaguchi and N. Mochizuki (2009). "The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors." Science **323**(5913): 524-527.

Khoury, T., V. Nagrale, M. Opyrchal, X. Peng, D. Wang and S. Yao (2018). "Prognostic Significance of Stromal Versus Intratumoral Infiltrating Lymphocytes in Different Subtypes of Breast Cancer Treated With Cytotoxic Neoadjuvant Chemotherapy." Appl Immunohistochem Mol Morphol **26**(8): 523-532.

Kihara, A. and Y. Igarashi (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**(47): 49243-49250.

Kim, E. S., J. S. Kim, S. G. Kim, S. Hwang, C. H. Lee and A. Moon (2011). "Sphingosine 1-phosphate regulates matrix metalloproteinase-9 expression and breast cell invasion through S1P3-Galphaq coupling." J Cell Sci **124**(Pt 13): 2220-2230.

Kim, M. H., J. W. Park, E. J. Lee, S. Kim, S. H. Shin, J. H. Ahn, Y. Jung, I. Park and W. J. Park (2018). "C16ceramide and sphingosine 1phosphate/S1PR2 have opposite effects on cell growth through mTOR signaling pathway regulation." Oncol Rep **40**(5): 2977-2987.

Kitatani, K., K. Sheldon, V. Rajagopalan, V. Anelli, R. W. Jenkins, Y. Sun, G. A. Grabowski, L. M. Obeid and Y. A. Hannun (2009). "Involvement of acid beta-glucosidase 1 in the salvage pathway of ceramide formation." J Biol Chem **284**(19): 12972-12978.

Ko, P., D. Kim, E. You, J. Jung, S. Oh, J. Kim, K. H. Lee and S. Rhee (2016). "Extracellular Matrix Rigidity-dependent Sphingosine-1-phosphate Secretion Regulates Metastatic Cancer Cell Invasion and Adhesion." Sci Rep **6**: 21564.

Kohno, T., H. Matsuyuki, Y. Inagaki and Y. Igarashi (2003). "Sphingosine 1-phosphate promotes cell migration through the activation of Cdc42 in Edg-6/S1P4-expressing cells." Genes Cells **8**(8): 685-697.

Kolter, T. and K. Sandhoff (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.

Koybasi, S., C. E. Senkal, K. Sundararaj, S. Spassieva, J. Bielawski, W. Osta, T. A. Day, J. C. Jiang, S. M. Jazwinski, Y. A. Hannun, L. M. Obeid and B. Ogretmen (2004). "Defects in cell growth regulation by C18:0-ceramide and longevity assurance gene 1 in human head and neck squamous cell carcinomas." J Biol Chem **279**(43): 44311-44319.

Kue, C. S., M. Y. Jung, D. Cho and T. S. Kim (2012). "C6-ceramide enhances Interleukin-12-mediated T helper type 1 cell responses through a cyclooxygenase-2-dependent pathway." Immunobiology **217**(6): 601-609.

Kue, C. S., H. X. Lim, M. Y. Jung, H. J. Hong, D. Cho and T. S. Kim (2013). "C6-ceramide in combination with transforming growth factor-beta enhances Treg cell differentiation and stable FoxP3 expression in vitro and in vivo." Immunobiology **218**(7): 952-959.

L

Ladoire, S., L. Arnould, L. Apetoh, B. Coudert, F. Martin, B. Chauffert, P. Fumoleau and F. Ghiringhelli (2008). "Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells." Clin Cancer Res **14**(8): 2413-2420.

Ladoire, S., L. Arnould, G. Mignot, L. Apetoh, C. Rebe, F. Martin, P. Fumoleau, B. Coudert and F. Ghiringhelli (2011). "T-bet expression in intratumoral lymphoid structures after neoadjuvant trastuzumab plus docetaxel for HER2-overexpressing breast carcinoma predicts survival." Br J Cancer **105**(3): 366-371.

Ladoire, S., L. Arnould, G. Mignot, B. Coudert, C. Rebe, F. Chalmin, J. Vincent, M. Bruchard, B. Chauffert, F. Martin, P. Fumoleau and F. Ghiringhelli (2011). "Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy." Breast Cancer Res Treat **125**(1): 65-72.

Lafont, E., R. Dupont, N. Andrieu-Abadie, T. Okazaki, K. Schulze-Osthoff, T. Levade, H. Benoist and B. Segui (2012). "Ordering of ceramide formation and caspase-9 activation in CD95L-induced Jurkat leukemia T cell apoptosis." *Biochim Biophys Acta* **1821**(4): 684-693.

Lafont, E., D. Milhas, S. Carpentier, V. Garcia, Z. X. Jin, H. Umehara, T. Okazaki, K. Schulze-Osthoff, T. Levade, H. Benoist and B. Segui (2010). "Caspase-mediated inhibition of sphingomyelin synthesis is involved in FasL-triggered cell death." *Cell Death Differ* **17**(4): 642-654.

LaMontagne, K., A. Littlewood-Evans, C. Schnell, T. O'Reilly, L. Wyder, T. Sanchez, B. Probst, J. Butler, A. Wood, G. Liau, E. Billy, A. Theuer, T. Hla and J. Wood (2006). "Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization." *Cancer Res* **66**(1): 221-231.

Laviad, E. L., L. Albee, I. Pankova-Kholmyansky, S. Epstein, H. Park, A. H. Merrill, Jr. and A. H. Futerman (2008). "Characterization of ceramide synthase 2: tissue distribution, substrate specificity, and inhibition by sphingosine 1-phosphate." *J Biol Chem* **283**(9): 5677-5684.

Le Stunff, H., I. Galve-Roperh, C. Peterson, S. Milstien and S. Spiegel (2002). "Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis." *J Cell Biol* **158**(6): 1039-1049.

Lee, H., J. Deng, M. Kujawski, C. Yang, Y. Liu, A. Herrmann, M. Kortylewski, D. Horne, G. Somlo, S. Forman, R. Jove and H. Yu (2010). "STAT3-induced S1PR1 expression is crucial for persistent STAT3 activation in tumors." *Nat Med* **16**(12): 1421-1428.

Lee, J. Y., C. N. Skon, Y. J. Lee, S. Oh, J. J. Taylor, D. Malhotra, M. K. Jenkins, M. G. Rosenfeld, K. A. Hogquist and S. C. Jameson (2015). "The transcription factor KLF2 restrains CD4(+) T follicular helper cell differentiation." *Immunity* **42**(2): 252-264.

Lee, M. J., J. R. Van Brocklyn, S. Thangada, C. H. Liu, A. R. Hand, R. Menzeleev, S. Spiegel and T. Hla (1998). "Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1." *Science* **279**(5356): 1552-1555.

Lehmann, B. D., J. A. Bauer, X. Chen, M. E. Sanders, A. B. Chakravarthy, Y. Shyr and J. A. Pietenpol (2011). "Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies." *J Clin Invest* **121**(7): 2750-2767.

Lei, F. J., B. H. Cheng, P. Y. Liao, H. C. Wang, W. C. Chang, H. C. Lai, J. C. Yang, Y. C. Wu, L. C. Chu and W. L. Ma (2018). "Survival benefit of sphingosin-1-phosphate and receptors expressions in breast cancer patients." *Cancer Med* **7**(8): 3743-3754.

Lepley, D., J. H. Paik, T. Hla and F. Ferrer (2005). "The G protein-coupled receptor S1P2 regulates Rho/Rho kinase pathway to inhibit tumor cell migration." *Cancer Res* **65**(9): 3788-3795.

Levy, M. and A. H. Futerman (2010). "Mammalian ceramide synthases." *IUBMB Life* **62**(5): 347-356.

Li, F., R. Xu, B. E. Low, C. L. Lin, M. Garcia-Barros, J. Schrandt, I. Mileva, A. Snider, C. K. Luo, X. C. Jiang, M. S. Li, Y. A. Hannun, L. M. Obeid, M. V. Wiles and C. Mao (2018). "Alkaline ceramidase 2 is essential for the homeostasis of plasma sphingoid bases and their phosphates." *FASEB J* **32**(6): 3058-3069.

Li, G., D. Liu, E. T. Kimchi, J. T. Kaifi, X. Qi, Y. Manjunath, X. Liu, T. Deering, D. M. Avella, T. Fox, D. C. Rockey, T. D. Schell, M. Kester and K. F. Staveley-O'Carroll (2018). "Nanoliposome C6-Ceramide Increases the Anti-tumor Immune Response and Slows Growth of Liver Tumors in Mice." *Gastroenterology* **154**(4): 1024-1036 e1029.

Li, Y. H., H. T. Liu, J. Xu, A. Y. Xing, J. Zhang, Y. W. Wang, G. Yin and P. Gao (2018). "The value of detection of S100A8 and ASAHI in predicting the chemotherapy response for breast cancer patients." *Hum Pathol* **74**: 156-163.

Liakath-Ali, K., V. E. Vancollie, C. J. Lelliott, A. O. Speak, D. Lafont, H. J. Protheroe, C. Ingvorsen, A. Galli, A. Green, D. Gleeson, E. Ryder, L. Glover, G. Vizcay-Barrena, N. A. Karp, M. J. Arends, T. Brenn, S. Spiegel, D. J. Adams, F. M. Watt and L. van der Weyden (2016). "Alkaline ceramidase 1 is essential for mammalian skin homeostasis and regulating whole-body energy expenditure." *J Pathol* **239**(3): 374-383.

Liang, Y. J., Y. Ding, S. B. Levery, M. Lobaton, K. Handa and S. I. Hakomori (2013). "Differential expression profiles of glycosphingolipids in human breast cancer stem cells vs. cancer non-stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(13): 4968-4973.

Liang, Y. J., C. Y. Wang, I. A. Wang, Y. W. Chen, L. T. Li, C. Y. Lin, M. Y. Ho, T. L. Chou, Y. H. Wang, S. P. Chiou, Y. J. Lin and J. Yu (2017). "Interaction of glycosphingolipids GD3 and GD2 with growth factor receptors maintains breast cancer stem cell phenotype." *Oncotarget* **8**(29): 47454-47473.

Liu, F., R. Lang, J. Zhao, X. Zhang, G. A. Pringle, Y. Fan, D. Yin, F. Gu, Z. Yao and L. Fu (2011). "CD8(+) cytotoxic T cell and FOXP3(+) regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes." *Breast Cancer Res Treat* **130**(2): 645-655.

Liu, G., S. Burns, G. Huang, K. Boyd, R. L. Proia, R. A. Flavell and H. Chi (2009). "The receptor S1P1 overrides regulatory T cell-mediated immune suppression through Akt-mTOR." *Nat Immunol* **10**(7): 769-777.

Liu, G., K. Yang, S. Burns, S. Shrestha and H. Chi (2010). "The S1P(1)-mTOR axis directs the reciprocal differentiation of T(H)1 and T(reg) cells." *Nat Immunol* **11**(11): 1047-1056.

Liu, J., P. Sun, Y. Sun, A. Liu, D. You, F. Jiang and Y. Sun (2014). "Expression of glucosylceramide synthase in invasive ductal breast cancer may be correlated with high estrogen receptor status and low HER-2 status." *Diagn Pathol* **9**: 22.

Liu, S., J. Lachapelle, S. Leung, D. Gao, W. D. Foulkes and T. O. Nielsen (2012). "CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer." *Breast Cancer Res* **14**(2): R48.

Liu, Y., R. Wada, T. Yamashita, Y. Mi, C. X. Deng, J. P. Hobson, H. M. Rosenfeldt, V. E. Nava, S. S. Chae, M. J. Lee, C. H. Liu, T. Hla, S. Spiegel and R. L. Proia (2000). "Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation." *J Clin Invest* **106**(8): 951-961.

Liu, Y. Y., T. Y. Han, A. E. Giuliano and M. C. Cabot (1999). "Expression of glucosylceramide synthase, converting ceramide to glucosylceramide, confers adriamycin resistance in human breast cancer cells." *J Biol Chem* **274**(2): 1140-1146.

Liu, Y. Y., T. Y. Han, A. E. Giuliano, N. Hansen and M. C. Cabot (2000). "Uncoupling ceramide glycosylation by transfection of glucosylceramide synthase antisense reverses adriamycin resistance." *J Biol Chem* **275**(10): 7138-7143.

Loi, S., N. Sirtaine, F. Piette, R. Salgado, G. Viale, F. Van Eeno, G. Rouas, P. Francis, J. P. Crown, E. Hitre, E. de Azambuja, E. Quinaux, A. Di Leo, S. Michiels, M. J. Piccart and C. Sotiriou (2013). "Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98." *J Clin Oncol* **31**(7): 860-867.

Long, J. S., J. Edwards, C. Watson, S. Tovey, K. M. Mair, R. Schiff, V. Natarajan, N. J. Pyne and S. Pyne (2010). "Sphingosine kinase 1 induces tolerance to human epidermal growth factor receptor 2 and prevents formation of a migratory phenotype in response to sphingosine 1-phosphate in estrogen receptor-positive breast cancer cells." *Mol Cell Biol* **30**(15): 3827-3841.

Long, J. S., Y. Fujiwara, J. Edwards, C. L. Tannahill, G. Tigyi, S. Pyne and N. J. Pyne (2010). "Sphingosine 1-phosphate receptor 4 uses HER2 (ERBB2) to regulate extracellular signal

regulated kinase-1/2 in MDA-MB-453 breast cancer cells." J Biol Chem **285**(46): 35957-35966.

Lopes Pinheiro, M. A., J. Kroon, M. Hoogenboezem, D. Geerts, B. van Het Hof, S. M. van der Pol, J. D. van Buul and H. E. de Vries (2016). "Acid Sphingomyelinase-Derived Ceramide Regulates ICAM-1 Function during T Cell Transmigration across Brain Endothelial Cells." J Immunol **196**(1): 72-79.

Lopez-Montero, I., M. Velez and P. F. Devaux (2007). "Surface tension induced by sphingomyelin to ceramide conversion in lipid membranes." Biochim Biophys Acta **1768**(3): 553-561.

Lucci, A., T. Y. Han, Y. Y. Liu, A. E. Giuliano and M. C. Cabot (1999). "Modification of ceramide metabolism increases cancer cell sensitivity to cytotoxics." Int J Oncol **15**(3): 541-546.

Luzi, P., M. A. Rafi and D. A. Wenger (1995). "Structure and organization of the human galactocerebrosidase (GALC) gene." Genomics **26**(2): 407-409.

Maceyka, M. and S. Spiegel (2014). "Sphingolipid metabolites in inflammatory disease." Nature **510**(7503): 58-67.

M

Mackay, L. K., A. Braun, B. L. Macleod, N. Collins, C. Tebartz, S. Bedoui, F. R. Carbone and T. Gebhardt (2015). "Cutting edge: CD69 interference with sphingosine-1-phosphate receptor function regulates peripheral T cell retention." J Immunol **194**(5): 2059-2063.

Magee, J. A., E. Piskounova and S. J. Morrison (2012). "Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty." Cancer Cell **21**(3): 283-296.

Mahmoud, S. M., E. C. Paish, D. G. Powe, R. D. Macmillan, M. J. Grainge, A. H. Lee, I. O. Ellis and A. R. Green (2011). "Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer." J Clin Oncol **29**(15): 1949-1955.

Marekov, L. N. and P. M. Steinert (1998). "Ceramide is bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope." J Biol Chem **273**(28): 17763-17770.

Marquina, G., H. Waki, L. E. Fernandez, K. Kon, A. Carr, O. Valiente, R. Perez and S. Ando (1996). "Gangliosides expressed in human breast cancer." Cancer Res **56**(22): 5165-5171.

Martin, J. L., H. C. de Silva, M. Z. Lin, C. D. Scott and R. C. Baxter (2014). "Inhibition of insulin-like growth factor-binding protein-3 signaling through sphingosine kinase-1 sensitizes triple-negative breast cancer cells to EGF receptor blockade." Mol Cancer Ther **13**(2): 316-328.

Martin, J. L., M. Z. Lin, E. M. McGowan and R. C. Baxter (2009). "Potentiation of growth factor signaling by insulin-like growth factor-binding protein-3 in breast epithelial cells requires sphingosine kinase activity." J Biol Chem **284**(38): 25542-25552.

Martinet, L., I. Garrido, T. Filleron, S. Le Guellec, E. Bellard, J. J. Fournie, P. Rochaix and J. P. Girard (2011). "Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer." Cancer Res **71**(17): 5678-5687.

Marvaso, G., A. Barone, N. Amodio, L. Raimondi, V. Agosti, E. Altomare, V. Scotti, A. Lombardi, R. Bianco, C. Bianco, M. Caraglia, P. Tassone and P. Tagliaferri (2014). "Sphingosine analog fingolimod (FTY720) increases radiation sensitivity of human breast cancer cells in vitro." Cancer Biol Ther **15**(6): 797-805.

Matloubian, M., C. G. Lo, G. Cinamon, M. J. Lesneski, Y. Xu, V. Brinkmann, M. L. Allende, R. L. Proia and J. G. Cyster (2004). "Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1." Nature **427**(6972): 355-360.

Mehling, M., V. Brinkmann, J. Antel, A. Bar-Or, N. Goebels, C. Vedrine, C. Kristofic, J. Kuhle, R. L. Lindberg and L. Kappos (2008). "FTY720 therapy exerts differential effects on T cell subsets in multiple sclerosis." *Neurology* **71**(16): 1261-1267.

Mendoza, A., B. Breart, W. D. Ramos-Perez, L. A. Pitt, M. Gobert, M. Sunkara, J. J. Lafaille, A. J. Morris and S. R. Schwab (2012). "The transporter Spns2 is required for secretion of lymph but not plasma sphingosine-1-phosphate." *Cell Rep* **2**(5): 1104-1110.

Mendoza, A., V. Fang, C. Chen, M. Serasinghe, A. Verma, J. Muller, V. S. Chaluvadi, M. L. Dustin, T. Hla, O. Elemento, J. E. Chipuk and S. R. Schwab (2017). "Lymphatic endothelial S1P promotes mitochondrial function and survival in naive T cells." *Nature* **546**(7656): 158-161.

Mittendorf, E. A., A. Ardavanis, J. K. Litton, N. M. Shumway, D. F. Hale, J. L. Murray, S. A. Perez, S. Ponniah, C. N. Baxevanis, M. Papamichail and G. E. Peoples (2016). "Primary analysis of a prospective, randomized, single-blinded phase II trial evaluating the HER2 peptide GP2 vaccine in breast cancer patients to prevent recurrence." *Oncotarget* **7**(40): 66192-66201.

Mittendorf, E. A., A. Ardavanis, J. Symanowski, J. L. Murray, N. M. Shumway, J. K. Litton, D. F. Hale, S. A. Perez, E. A. Anastasopoulou, N. F. Pistamaltzian, S. Ponniah, C. N. Baxevanis, E. von Hofe, M. Papamichail and G. E. Peoples (2016). "Primary analysis of a prospective, randomized, single-blinded phase II trial evaluating the HER2 peptide AE37 vaccine in breast cancer patients to prevent recurrence." *Ann Oncol* **27**(7): 1241-1248.

Miyaji, M., Z. X. Jin, S. Yamaoka, R. Amakawa, S. Fukuhara, S. B. Sato, T. Kobayashi, N. Domae, T. Mimori, E. T. Bloom, T. Okazaki and H. Umehara (2005). "Role of membrane sphingomyelin and ceramide in platform formation for Fas-mediated apoptosis." *J Exp Med* **202**(2): 249-259.

Miyan, M., J. Schmidt-Mende, R. Kiessling, I. Poschke and J. de Boniface (2016). "Differential tumor infiltration by T-cells characterizes intrinsic molecular subtypes in breast cancer." *J Transl Med* **14**(1): 227.

Miyashita, M., H. Sasano, K. Tamaki, H. Hirakawa, Y. Takahashi, S. Nakagawa, G. Watanabe, H. Tada, A. Suzuki, N. Ohuchi and T. Ishida (2015). "Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study." *Breast Cancer Res* **17**: 124.

Mizugishi, K., T. Yamashita, A. Olivera, G. F. Miller, S. Spiegel and R. L. Proia (2005). "Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development." *Mol Cell Biol* **25**(24): 11113-11121.

Mizukami, Y., K. Kono, Y. Kawaguchi, H. Akaike, K. Kamimura, H. Sugai and H. Fujii (2008). "CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer." *Int J Cancer* **122**(10): 2286-2293.

Mizutani, Y., A. Kihara and Y. Igarashi (2004). "Identification of the human sphingolipid C4-hydroxylase, hDES2, and its up-regulation during keratinocyte differentiation." *FEBS Lett* **563**(1-3): 93-97.

Moeller, M., M. H. Kershaw, R. Cameron, J. A. Westwood, J. A. Trapani, M. J. Smyth and P. K. Darcy (2007). "Sustained antigen-specific antitumor recall response mediated by gene-modified CD4+ T helper-1 and CD8+ T cells." *Cancer Res* **67**(23): 11428-11437.

Morad, S. A., J. C. Levin, S. S. Shanmugavelandy, M. Kester, G. Fabrias, C. Bedia and M. C. Cabot (2012). "Ceramide--antiestrogen nanoliposomal combinations--novel impact of hormonal therapy in hormone-insensitive breast cancer." *Mol Cancer Ther* **11**(11): 2352-2361.

Morgan, R. A., J. C. Yang, M. Kitano, M. E. Dudley, C. M. Laurencot and S. A. Rosenberg (2010). "Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2." Mol Ther **18**(4): 843-851.

Moriyama, S., N. Takahashi, J. A. Green, S. Hori, M. Kubo, J. G. Cyster and T. Okada (2014). "Sphingosine-1-phosphate receptor 2 is critical for follicular helper T cell retention in germinal centers." J Exp Med **211**(7): 1297-1305.

Moro, K., T. Kawaguchi, J. Tsuchida, E. Gabriel, Q. Qi, L. Yan, T. Wakai, K. Takabe and M. Nagahashi (2018). "Ceramide species are elevated in human breast cancer and are associated with less aggressiveness." Oncotarget **9**(28): 19874-19890.

Mrad, M., C. Imbert, V. Garcia, F. Rambow, N. Therville, S. Carpentier, B. Segui, T. Levade, R. Azar, J. C. Marine, M. Diab-Assaf, C. Colacios and N. Andrieu-Abadie (2016). "Downregulation of sphingosine kinase-1 induces protective tumor immunity by promoting M1 macrophage response in melanoma." Oncotarget **7**(44): 71873-71886.

Mulens, V., A. de la Torre, P. Marinello, R. Rodriguez, J. Cardoso, R. Diaz, M. O'Farrill, A. Macias, C. Viada, G. Saurez, A. Carr, T. Crombet, Z. Mazorra, R. Perez and L. E. Fernandez (2010). "Immunogenicity and safety of a NeuGcGM3 based cancer vaccine: Results from a controlled study in metastatic breast cancer patients." Hum Vaccin **6**(9).

Mulligan, A. M., D. Pinnaduwege, S. Tchatchou, S. B. Bull and I. L. Andrulis (2015). "Validation of Intratumoral T-bet+ Lymphoid Cells as Predictors of Disease-Free Survival in Breast Cancer." Cancer Immunol Res **4**(1): 41-48.

Mulligan, A. M., I. Raitman, L. Feeley, D. Pinnaduwege, L. T. Nguyen, F. P. O'Malley, P. S. Ohashi and I. L. Andrulis (2013). "Tumoral lymphocytic infiltration and expression of the chemokine CXCL10 in breast cancers from the Ontario Familial Breast Cancer Registry." Clin Cancer Res **19**(2): 336-346.

N

Nagahashi, M., S. Ramachandran, E. Y. Kim, J. C. Allegood, O. M. Rashid, A. Yamada, R. Zhao, S. Milstien, H. Zhou, S. Spiegel and K. Takabe (2012). "Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 1 promotes breast cancer progression by stimulating angiogenesis and lymphangiogenesis." Cancer Res **72**(3): 726-735.

Nagahashi, M., J. Tsuchida, K. Moro, M. Hasegawa, K. Tatsuda, I. A. Woelfel, K. Takabe and T. Wakai (2016). "High levels of sphingolipids in human breast cancer." J Surg Res **204**(2): 435-444.

Nagahashi, M., A. Yamada, T. Aoyagi, J. Allegood, T. Wakai, S. Spiegel and K. Takabe (2016). "Sphingosine-1-phosphate in the lymphatic fluid determined by novel methods." Heliyon **2**(12): e00219.

Nagahashi, M., A. Yamada, H. Miyazaki, J. C. Allegood, J. Tsuchida, T. Aoyagi, W. C. Huang, K. P. Terracina, B. J. Adams, O. M. Rashid, S. Milstien, T. Wakai, S. Spiegel and K. Takabe (2016). "Interstitial Fluid Sphingosine-1-Phosphate in Murine Mammary Gland and Cancer and Human Breast Tissue and Cancer Determined by Novel Methods." J Mammary Gland Biol Neoplasia **21**(1-2): 9-17.

Nam, S. Y., A. A. Amoscato and Y. J. Lee (2002). "Low glucose-enhanced TRAIL cytotoxicity is mediated through the ceramide-Akt-FLIP pathway." Oncogene **21**(3): 337-346.

Nanda, R., L. Q. Chow, E. C. Dees, R. Berger, S. Gupta, R. Geva, L. Pusztai, K. Pathiraja, G. Aktan, J. D. Cheng, V. Karantza and L. Buisseret (2016). "Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study." J Clin Oncol **34**(21): 2460-2467.

Nedelkovska, H., A. F. Rosenberg, S. P. Hilchey, O. Hyrien, W. R. Burack, S. A. Quataert, C. M. Baker, M. Azadniv, S. L. Welle, S. M. Ansell, M. Kim and S. H. Bernstein (2016).

"Follicular Lymphoma Tregs Have a Distinct Transcription Profile Impacting Their Migration and Retention in the Malignant Lymph Node." *PLoS One* **11**(5): e0155347.

Neubauer, H. A., D. H. Pham, J. R. Zebol, P. A. Moretti, A. L. Peterson, T. M. Leclercq, H. Chan, J. A. Powell, M. R. Pitman, M. S. Samuel, C. S. Bonder, D. J. Creek, B. L. Gliddon and S. M. Pitson (2016). "An oncogenic role for sphingosine kinase 2." *Oncotarget* **7**(40): 64886-64899.

Newcomb, B., C. Rhein, I. Mileva, R. Ahmad, C. J. Clarke, J. Snider, L. M. Obeid and Y. A. Hannun (2018). "Identification of an acid sphingomyelinase ceramide kinase pathway in the regulation of the chemokine CCL5." *J Lipid Res* **59**(7): 1219-1229.

Newton, J., S. Lima, M. Maceyka and S. Spiegel (2015). "Revisiting the sphingolipid rheostat: Evolving concepts in cancer therapy." *Exp Cell Res* **333**(2): 195-200.

Nijnik, A., S. Clare, C. Hale, J. Chen, C. Raisen, L. Mottram, M. Lucas, J. Estabel, E. Ryder, H. Adissu, P. Sanger Mouse Genetics, N. C. Adams, R. Ramirez-Solis, J. K. White, K. P. Steel, G. Dougan and R. E. Hancock (2012). "The role of sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 in immune system function." *J Immunol* **189**(1): 102-111.

Nofer, J. R., M. van der Giet, M. Tolle, I. Wolinska, K. von Wnuck Lipinski, H. A. Baba, U. J. Tietge, A. Godecke, I. Ishii, B. Kleuser, M. Schafers, M. Fobker, W. Zidek, G. Assmann, J. Chun and B. Levkau (2004). "HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3." *J Clin Invest* **113**(4): 569-581.

Nohara, K., F. Wang and S. Spiegel (1998). "Glycosphingolipid composition of MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cell lines." *Breast Cancer Res Treat* **48**(2): 149-157.

Novgorodov, A. S., M. El-Alwani, J. Bielawski, L. M. Obeid and T. I. Gudz (2007). "Activation of sphingosine-1-phosphate receptor S1P5 inhibits oligodendrocyte progenitor migration." *FASEB J* **21**(7): 1503-1514.

O

O'Byrne, D. and D. Sansom (2000). "Lack of costimulation by both sphingomyelinase and C2 ceramide in resting human T cells." *Immunology* **100**(2): 225-230.

O'Shaughnessy, J., M. Campone, E. Brain, P. Neven, D. Hayes, I. Bondarenko, T. W. Griffin, J. Martin, P. De Porre, T. Kheoh, M. K. Yu, W. Peng and S. Johnston (2016). "Abiraterone acetate, exemestane or the combination in postmenopausal patients with estrogen receptor-positive metastatic breast cancer." *Ann Oncol* **27**(1): 106-113.

O'Sullivan, C. and K. K. Dev (2013). "The structure and function of the S1P1 receptor." *Trends Pharmacol Sci* **34**(7): 401-412.

Obeid, L. M., C. M. Linaudic, L. A. Karolak and Y. A. Hannun (1993). "Programmed cell death induced by ceramide." *Science* **259**(5102): 1769-1771.

Oda, N., K. Shimazu, Y. Naoi, K. Morimoto, A. Shimomura, M. Shimoda, N. Kagara, N. Maruyama, S. J. Kim and S. Noguchi (2012). "Intratumoral regulatory T cells as an independent predictive factor for pathological complete response to neoadjuvant paclitaxel followed by 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide in breast cancer patients." *Breast Cancer Res Treat* **136**(1): 107-116.

Ogawa, C., A. Kihara, M. Gokoh and Y. Igarashi (2003). "Identification and characterization of a novel human sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase, hSPP2." *J Biol Chem* **278**(2): 1268-1272.

Ogretmen, B., B. J. Pettus, M. J. Rossi, R. Wood, J. Usta, Z. Szulc, A. Bielawska, L. M. Obeid and Y. A. Hannun (2002). "Biochemical mechanisms of the generation of endogenous long chain ceramide in response to exogenous short chain ceramide in the A549 human lung adenocarcinoma cell line. Role for endogenous ceramide in mediating the action of exogenous ceramide." *J Biol Chem* **277**(15): 12960-12969.

- Ohno, Y., S. Suto, M. Yamanaka, Y. Mizutani, S. Mitsutake, Y. Igarashi, T. Sassa and A. Kihara (2010). "ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(43): 18439-18444.
- Ohotski, J., J. Edwards, B. Elsberger, C. Watson, C. Orange, E. Mallon, S. Pyne and N. J. Pyne (2012). "Identification of novel functional and spatial associations between sphingosine kinase 1, sphingosine 1-phosphate receptors and other signaling proteins that affect prognostic outcome in estrogen receptor-positive breast cancer." *Int J Cancer* **132**(3): 605-616.
- Ohotski, J., J. S. Long, C. Orange, B. Elsberger, E. Mallon, J. Doughty, S. Pyne, N. J. Pyne and J. Edwards (2012). "Expression of sphingosine 1-phosphate receptor 4 and sphingosine kinase 1 is associated with outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer." *Br J Cancer* **106**(8): 1453-1459.
- Okamoto, H., N. Takuwa, K. Gonda, H. Okazaki, K. Chang, Y. Yatomi, H. Shigematsu and Y. Takuwa (1998). "EDG1 is a functional sphingosine-1-phosphate receptor that is linked via a Gi/o to multiple signaling pathways, including phospholipase C activation, Ca²⁺ mobilization, Ras-mitogen-activated protein kinase activation, and adenylate cyclase inhibition." *J Biol Chem* **273**(42): 27104-27110.
- Olurinde, M. O., C. H. Shen, A. Drake, A. Bai and J. Chen (2011). "Persistence of tumor-infiltrating CD8 T cells is tumor-dependent but antigen-independent." *Cell Mol Immunol* **8**(5): 415-423.
- Oo, M. L., S. H. Chang, S. Thangada, M. T. Wu, K. Rezaul, V. Blaho, S. I. Hwang, D. K. Han and T. Hla (2011). "Engagement of S1P(1)-degradative mechanisms leads to vascular leak in mice." *J Clin Invest* **121**(6): 2290-2300.
- Oo, M. L., S. Thangada, M. T. Wu, C. H. Liu, T. L. Macdonald, K. R. Lynch, C. Y. Lin and T. Hla (2007). "Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor." *J Biol Chem* **282**(12): 9082-9089.
- Orsi, G., M. Barbolini, G. Ficarra, G. Tazzioli, P. Manni, T. Petrachi, I. Mastrolia, E. Orvieto, C. Spano, M. Prapa, S. Kaleci, R. D'Amico, V. Guarneri, M. V. Dieci, S. Cascinu, P. Conte, F. Piacentini and M. Dominici (2017). "GD2 expression in breast cancer." *Oncotarget* **8**(19): 31592-31600.
- Overbye, A., A. M. Holsaeter, F. Markus, N. Skalko-Basnet, T. G. Iversen, M. L. Torgersen, T. Sonstevold, O. Engebraaten, K. Flatmark, G. M. Maelandsmo, T. Skotland and K. Sandvig (2017). "Ceramide-containing liposomes with doxorubicin: time and cell-dependent effect of C6 and C12 ceramide." *Oncotarget* **8**(44): 76921-76934.
- Owczarek, T. B., J. Suchanski, B. Pula, A. M. Kmiecik, M. Chadalski, A. Jethon, P. Dziegiel and M. Ugorski (2013). "Galactosylceramide affects tumorigenic and metastatic properties of breast cancer cells as an anti-apoptotic molecule." *PLoS One* **8**(12): e84191.

P

- Pan, H., R. Gray, J. Braybrooke, C. Davies, C. Taylor, P. McGale, R. Peto, K. I. Pritchard, J. Bergh, M. Dowsett, D. F. Hayes and Ebctcg (2017). "20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence after Stopping Endocrine Therapy at 5 Years." *N Engl J Med* **377**(19): 1836-1846.
- Pappu, R., S. R. Schwab, I. Cornelissen, J. P. Pereira, J. B. Regard, Y. Xu, E. Camerer, Y. W. Zheng, Y. Huang, J. G. Cyster and S. R. Coughlin (2007). "Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate." *Science* **316**(5822): 295-298.
- Payne, A. W., D. K. Pant, T. C. Pan and L. A. Chodosh (2014). "Ceramide kinase promotes tumor cell survival and mammary tumor recurrence." *Cancer Res* **74**(21): 6352-6363.

Pedrosa, L. R., T. L. Ten Hagen, R. Suss, A. van Hell, A. M. Eggermont, M. Verheij and G. A. Koning (2015). "Short-chain glycosphingolipids promote intracellular mitoxantrone delivery from novel nanoliposomes into breast cancer cells." *Pharm Res* **32**(4): 1354-1367.

Pedrosa, L. R., A. van Hell, R. Suss, W. J. van Blitterswijk, A. L. Seynhaeve, W. A. van Cappellen, A. M. Eggermont, T. L. ten Hagen, M. Verheij and G. A. Koning (2013). "Improving intracellular doxorubicin delivery through nanoliposomes equipped with selective tumor cell membrane permeabilizing short-chain sphingolipids." *Pharm Res* **30**(7): 1883-1895.

Peres, M., A. Montfort, N. Andrieu-Abadie, C. Colacios and B. Segui (2018). "S1P: the elixir of life for naive T cells." *Cell Mol Immunol* **15**(7): 657-659.

Perou, C. M., T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lonning, A. L. Borresen-Dale, P. O. Brown and D. Botstein (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." *Nature* **406**(6797): 747-752.

Pham, T. H., P. Baluk, Y. Xu, I. Grigorova, A. J. Bankovich, R. Pappu, S. R. Coughlin, D. M. McDonald, S. R. Schwab and J. G. Cyster (2010). "Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning." *J Exp Med* **207**(1): 17-27.

Pham, T. H., T. Okada, M. Matloubian, C. G. Lo and J. G. Cyster (2008). "S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by G alpha i-coupled receptors to promote T cell egress." *Immunity* **28**(1): 122-133.

Pitson, S. M., P. A. Moretti, J. R. Zebol, H. E. Lynn, P. Xia, M. A. Vadas and B. W. Wattenberg (2003). "Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation." *EMBO J* **22**(20): 5491-5500.

Poissonnier, A., D. Sanseau, M. Le Gallo, M. Malleter, N. Levoine, R. Viel, L. Morere, A. Penna, P. Blanco, A. Dupuy, F. Poizeau, A. Fautrel, J. Seneschal, F. Jouan, J. Ritz, E. Forcade, N. Rioux, C. Contin-Bordes, T. Ducret, A. M. Vacher, P. A. Barrow, R. J. Flynn, P. Vacher and P. Legembre (2016). "CD95-Mediated Calcium Signaling Promotes T Helper 17 Trafficking to Inflamed Organs in Lupus-Prone Mice." *Immunity* **45**(1): 209-223.

Polk, A., I. M. Svane, M. Andersson and D. Nielsen (2018). "Checkpoint inhibitors in breast cancer - Current status." *Cancer Treat Rev* **63**: 122-134.

Ponnapakam, A. P., J. Liu, K. N. Bhinge, B. A. Drew, T. L. Wang, J. W. Antoon, T. T. Nguyen, P. S. Dupart, Y. Wang, M. Zhao, Y. Y. Liu, M. Foroozesh and B. S. Beckman (2014). "3-Ketone-4,6-diene ceramide analogs exclusively induce apoptosis in chemo-resistant cancer cells." *Bioorg Med Chem* **22**(4): 1412-1420.

Ponnusamy, S., S. P. Selvam, S. Mehrotra, T. Kawamori, A. J. Snider, L. M. Obeid, Y. Shao, R. Sabbadini and B. Ogretmen (2012). "Communication between host organism and cancer cells is transduced by systemic sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signalling to regulate tumour metastasis." *EMBO Mol Med* **4**(8): 761-775.

Potapenko, I. O., T. Luders, H. G. Russnes, A. Helland, T. Sorlie, V. N. Kristensen, S. Nord, O. C. Lingjaerde, A. L. Borresen-Dale and V. D. Haakensen (2015). "Glycan-related gene expression signatures in breast cancer subtypes; relation to survival." *Mol Oncol* **9**(4): 861-876.

Priceman, S. J., S. Shen, L. Wang, J. Deng, C. Yue, M. Kujawski and H. Yu (2014). "S1PR1 is crucial for accumulation of regulatory T cells in tumors via STAT3." *Cell Rep* **6**(6): 992-999.

Puneet, P., C. T. Yap, L. Wong, Y. Lam, D. R. Koh, S. Mochhala, J. Pfeilschifter, A. Huwiler and A. J. Melendez (2010). "SphK1 regulates proinflammatory responses associated with endotoxin and polymicrobial sepsis." *Science* **328**(5983): 1290-1294.

Purwaha, P., F. Gu, D. W. B. Piyarathna, T. Rajendiran, A. Ravindran, A. R. Omilian, S. Jiralerspong, G. Das, C. Morrison, C. Ambrosone, C. Coarfa, N. Putluri and A. Sreekumar (2018). "Unbiased Lipidomic Profiling of Triple-Negative Breast Cancer Tissues Reveals the Association of Sphingomyelin Levels with Patient Disease-Free Survival." Metabolites **8**(3).
Pusztai, L., T. Karn, A. Safonov, M. M. Abu-Khalaf and G. Bianchini (2016). "New Strategies in Breast Cancer: Immunotherapy." Clin Cancer Res **22**(9): 2105-2110.

R

Rani, C. S., A. Abe, Y. Chang, N. Rosenzweig, A. R. Saltiel, N. S. Radin and J. A. Shayman (1995). "Cell cycle arrest induced by an inhibitor of glucosylceramide synthase. Correlation with cyclin-dependent kinases." J Biol Chem **270**(6): 2859-2867.
Rathinasamy, A., C. Domschke, Y. Ge, H. H. Bohm, S. Dettling, D. Jansen, F. Lasitschka, L. Umansky, M. H. Graler, J. Hartmann, C. Herold-Mende, F. Schuetz and P. Beckhove (2017). "Tumor specific regulatory T cells in the bone marrow of breast cancer patients selectively upregulate the emigration receptor S1P1." Cancer Immunol Immunother **66**(5): 593-603.
Resop, R. S., M. Douaisi, J. Craft, L. C. Jachimowski, B. Blom and C. H. Uittenbogaart (2016). "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 **138**(2): 551-557 e558.
Restifo, N. P. (2014). "Big bang theory of stem-like T cells confirmed." Blood **124**(4): 476-477.
Rex, K., S. Jeffries, M. L. Brown, T. Carlson, A. Coxon, F. Fajardo, B. Frank, D. Gustin, A. Kamb, P. D. Kassner, S. Li, Y. Li, K. Morgenstern, M. Plant, K. Quon, A. Ruefli-Brasse, J. Schmidt, E. Swearingen, N. Walker, Z. Wang, J. E. Watson, D. Wickramasinghe, M. Wong, G. Xu and H. Wesche (2013). "Sphingosine kinase activity is not required for tumor cell viability." PLoS One **8**(7): e68328.
Rieck, M., C. Kremser, K. Jobin, E. Mettke, C. Kurts, M. Graler, K. Willecke and W. Kolanus (2017). "Ceramide synthase 2 facilitates S1P-dependent egress of thymocytes into the circulation in mice." Eur J Immunol **47**(4): 677-684.
Rivera, J., R. L. Proia and A. Olivera (2008). "The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity." Nat Rev Immunol **8**(10): 753-763.
Roberts, C. G., E. Gurisik, T. J. Biden, R. L. Sutherland and A. J. Butt (2007). "Synergistic cytotoxicity between tamoxifen and the plant toxin persin in human breast cancer cells is dependent on Bim expression and mediated by modulation of ceramide metabolism." Mol Cancer Ther **6**(10): 2777-2785.
Ruckhaberle, E., U. Holtrich, K. Engels, L. Hanker, R. Gatje, D. Metzler, T. Karn, M. Kaufmann and A. Rody (2009). "Acid ceramidase 1 expression correlates with a better prognosis in ER-positive breast cancer." Climacteric **12**(6): 502-513.
Ruckhaberle, E., T. Karn, L. Hanker, R. Gatje, D. Metzler, U. Holtrich, M. Kaufmann and A. Rody (2009). "Prognostic relevance of glucosylceramide synthase (GCS) expression in breast cancer." J Cancer Res Clin Oncol **135**(1): 81-90.
Ruckhaberle, E., T. Karn, A. Rody, L. Hanker, R. Gatje, D. Metzler, U. Holtrich and M. Kaufmann (2009). "Gene expression of ceramide kinase, galactosyl ceramide synthase and ganglioside GD3 synthase is associated with prognosis in breast cancer." J Cancer Res Clin Oncol **135**(8): 1005-1013.
Ruckhaberle, E., A. Rody, K. Engels, R. Gaetje, G. von Minckwitz, S. Schiffmann, S. Grosch, G. Geisslinger, U. Holtrich, T. Karn and M. Kaufmann (2008). "Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **112**(1): 41-52.

Ruffell, B., A. Au, H. S. Rugo, L. J. Esserman, E. S. Hwang and L. M. Coussens (2012). "Leukocyte composition of human breast cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(8): 2796-2801.

Rugo, H. S., J. P. Delord, S. A. Im, P. A. Ott, S. A. Piha-Paul, P. L. Bedard, J. Sachdev, C. L. Tourneau, E. M. J. van Brummelen, A. Varga, R. Salgado, S. Loi, S. Saraf, D. Pietrangelo, V. Karantza and A. R. Tan (2018). "Safety and Antitumor Activity of Pembrolizumab in Patients with Estrogen Receptor-Positive/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer." *Clin Cancer Res* **24**(12): 2804-2811.

S

Salgado, R., C. Denkert, S. Demaria, N. Sirtaine, F. Klauschen, G. Pruneri, S. Wienert, G. Van den Eynden, F. L. Baehner, F. Penault-Llorca, E. A. Perez, E. A. Thompson, W. F. Symmans, A. L. Richardson, J. Brock, C. Criscitiello, H. Bailey, M. Ignatiadis, G. Floris, J. Sparano, Z. Kos, T. Nielsen, D. L. Rimm, K. H. Allison, J. S. Reis-Filho, S. Loibl, C. Sotiriou, G. Viale, S. Badve, S. Adams, K. Willard-Gallo and S. Loi (2015). "The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014." *Ann Oncol* **26**(2): 259-271.

Sanger, N., E. Ruckhaberle, B. Gyorffy, K. Engels, T. Heinrich, T. Fehm, A. Graf, U. Holtrich, S. Becker and T. Karn (2015). "Acid ceramidase is associated with an improved prognosis in both DCIS and invasive breast cancer." *Mol Oncol* **9**(1): 58-67.

Sankala, H. M., N. C. Hait, S. W. Paugh, D. Shida, S. Lepine, L. W. Elmore, P. Dent, S. Milstien and S. Spiegel (2007). "Involvement of sphingosine kinase 2 in p53-independent induction of p21 by the chemotherapeutic drug doxorubicin." *Cancer Res* **67**(21): 10466-10474.

Santuario-Facio, S. K., S. Cardona-Huerta, Y. X. Perez-Paramo, V. Trevino, F. Hernandez-Cabrera, A. Rojas-Martinez, G. Uscanga-Perales, J. L. Martinez-Rodriguez, L. Martinez-Jacobo, G. Padilla-Rivas, G. Munoz-Maldonado, J. F. Gonzalez-Guerrero, J. Valero-Gomez, A. L. Vazquez-Guerrero, H. G. Martinez-Rodriguez, A. Barboza-Quintana, O. Barboza-Quintana, R. Garza-Guajardo and R. Ortiz-Lopez (2017). "A New Gene Expression Signature for Triple Negative Breast Cancer Using Frozen Fresh Tissue before Neoadjuvant Chemotherapy." *Mol Med* **23**: 101-111.

Sarrío, D., S. M. Rodríguez-Pinilla, D. Hardisson, A. Cano, G. Moreno-Bueno and J. Palacios (2008). "Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype." *Cancer Res* **68**(4): 989-997.

Sassa, T., T. Hirayama and A. Kihara (2016). "Enzyme Activities of the Ceramide Synthases CERS2-6 Are Regulated by Phosphorylation in the C-terminal Region." *J Biol Chem* **291**(14): 7477-7487.

Savas, P., B. Virassamy, C. Ye, A. Salim, C. P. Mintoff, F. Caramia, R. Salgado, D. J. Byrne, Z. L. Teo, S. Dushyanthen, A. Byrne, L. Wein, S. J. Luen, C. Poliness, S. S. Nightingale, A. S. Skandarajah, D. E. Gyorki, C. M. Thornton, P. A. Beavis, S. B. Fox, P. K. Darcy, T. P. Speed, L. K. Mackay, P. J. Neeson and S. Loi (2018). "Single-cell profiling of breast cancer T cells reveals a tissue-resident memory subset associated with improved prognosis." *Nat Med* **24**(7): 986-993.

Scarlatti, F., C. Bauvy, A. Ventruti, G. Sala, F. Cluzeaud, A. Vandewalle, R. Ghidoni and P. Codogno (2004). "Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1." *J Biol Chem* **279**(18): 18384-18391.

Scharstuhl, A., H. A. Mutsaers, S. W. Pennings, F. G. Russel and F. A. Wagener (2009). "Involvement of VDAC, Bax and ceramides in the efflux of AIF from mitochondria during curcumin-induced apoptosis." *PLoS One* **4**(8): e6688.

Scheffel, M. J., K. Helke, P. Lu, J. S. Bowers, B. Ogretmen, E. Garrett-Mayer, C. M. Paulos and C. Voelkel-Johnson (2017). "Adoptive Transfer of Ceramide Synthase 6 Deficient Splenocytes Reduces the Development of Colitis." *Sci Rep* **7**(1): 15552.

Schiffmann, S., J. Sandner, K. Birod, I. Wobst, C. Angioni, E. Ruckhaberle, M. Kaufmann, H. Ackermann, J. Lotsch, H. Schmidt, G. Geisslinger and S. Grosch (2009). "Ceramide synthases and ceramide levels are increased in breast cancer tissue." *Carcinogenesis* **30**(5): 745-752.

Schmid, G., M. Guba, I. Ischenko, A. Papyan, M. Joka, S. Schrepfer, C. J. Bruns, K. W. Jauch, C. Heeschen and C. Graeb (2007). "The immunosuppressant FTY720 inhibits tumor angiogenesis via the sphingosine 1-phosphate receptor 1." *J Cell Biochem* **101**(1): 259-270.

Schmid, P., J. Cortes, J. C. S. Bergh, L. Pusztai, C. Denkert, S. Verma, H. L. McArthur, S. Kummel, Y. Ding, V. Karantza, T. Dang and R. A. Dent (2018). "KEYNOTE-522: Phase III study of pembrolizumab (pembro) + chemotherapy (chemo) vs placebo + chemo as neoadjuvant therapy followed by pembro vs placebo as adjuvant therapy for triple-negative breast cancer (TNBC)." *Journal of Clinical Oncology* **36**(15_suppl): TPS602-TPS602.

Schmid, P., C. Cruz, F. S. Braiteh, J. P. Eder, S. Tolaney, I. Kuter, R. Nanda, C. Chung, P. Cassier, J.-P. Delord, M. Gordon, Y. Li, B. Liu, C. O'Hear, M. Fassio, L. Molinero and L. A. Emens (2017). "Abstract 2986: Atezolizumab in metastatic TNBC (mTNBC): Long-term clinical outcomes and biomarker analyses." *Cancer Research* **77**(13 Supplement): 2986-2986.

Schmid, P., Y. H. Park, E. Muñoz-Couselo, S.-B. Kim, J. Sohn, S.-A. Im, E. Holgado, Y. Wang, T. Dang, G. Aktan and J. Cortés (2017). "Pembrolizumab (pembro) + chemotherapy (chemo) as neoadjuvant treatment for triple negative breast cancer (TNBC): Preliminary results from KEYNOTE-173." *Journal of Clinical Oncology* **35**(15_suppl): 556-556.

Schreiber, T. H. (2007). "The use of FoxP3 as a biomarker and prognostic factor for malignant human tumors." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16**(10): 1931-1934.

Schulze, T., S. Golfier, C. Tabeling, K. Rabel, M. H. Graler, M. Witzenzath and M. Lipp (2011). "Sphingosine-1-phosphate receptor 4 (S1P4) deficiency profoundly affects dendritic cell function and TH17-cell differentiation in a murine model." *FASEB J* **25**(11): 4024-4036.

Schwab, S. R., J. P. Pereira, M. Matloubian, Y. Xu, Y. Huang and J. G. Cyster (2005). "Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients." *Science* **309**(5741): 1735-1739.

Schwartzberg, L. S., D. A. Yardley, A. D. Elias, M. Patel, P. LoRusso, H. A. Burris, A. Gucalp, A. C. Peterson, M. E. Blaney, J. L. Steinberg, J. A. Gibbons and T. A. Traina (2017). "A Phase I/Ib Study of Enzalutamide Alone and in Combination with Endocrine Therapies in Women with Advanced Breast Cancer." *Clin Cancer Res* **23**(15): 4046-4054.

Sentelle, R. D., C. E. Senkal, W. Jiang, S. Ponnusamy, S. Gencer, S. P. Selvam, V. K. Ramshesh, Y. K. Peterson, J. J. Lemasters, Z. M. Szulc, J. Bielawski and B. Ogretmen (2012). "Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy." *Nat Chem Biol* **8**(10): 831-838.

Seo, A. N., H. J. Lee, E. J. Kim, H. J. Kim, M. H. Jang, H. E. Lee, Y. J. Kim, J. H. Kim and S. Y. Park (2013). "Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer." *Br J Cancer* **109**(10): 2705-2713.

Serpero, L. D., G. Filaci, A. Parodi, F. Battaglia, F. Kalli, D. Brogi, G. L. Mancardi, A. Uccelli and D. Fenoglio (2013). "Fingolimod modulates peripheral effector and regulatory T cells in MS patients." *J Neuroimmune Pharmacol* **8**(5): 1106-1113.

Severson, T. M., D. M. Wolf, C. Yau, J. Peeters, D. Wehkam, P. C. Schouten, S. F. Chin, I. J. Majewski, M. Michaut, A. Bosma, B. Pereira, T. Bismeyer, L. Wessels, C. Caldas, R. Bernards, I. M. Simon, A. M. Glas, S. Linn and L. van 't Veer (2017). "The BRCA1ness signature is associated significantly with response to PARP inhibitor treatment versus control in the I-SPY 2 randomized neoadjuvant setting." *Breast Cancer Res* **19**(1): 99.

Shamseddine, A. A., C. J. Clarke, B. Carroll, M. V. Airola, S. Mohammed, A. Rella, L. M. Obeid and Y. A. Hannun (2015). "P53-dependent upregulation of neutral sphingomyelinase-2: role in doxorubicin-induced growth arrest." Cell Death Dis **6**: e1947.

Shiao, S. L., B. Ruffell, D. G. DeNardo, B. A. Faddegon, C. C. Park and L. M. Coussens (2015). "TH2-Polarized CD4(+) T Cells and Macrophages Limit Efficacy of Radiotherapy." Cancer Immunol Res **3**(5): 518-525.

Silk, J. D., M. Salio, B. G. Reddy, D. Shepherd, U. Gileadi, J. Brown, S. H. Masri, P. Polzella, G. Ritter, G. S. Besra, E. Y. Jones, R. R. Schmidt and V. Cerundolo (2008). "Cutting edge: nonglycosidic CD1d lipid ligands activate human and murine invariant NKT cells." J Immunol **180**(10): 6452-6456.

Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-572.

Sinn, H. P. and H. Kreipe (2013). "A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition." Breast Care (Basel) **8**(2): 149-154.

Siow, D. L., C. D. Anderson, E. V. Berdyshev, A. Skobeleva, S. M. Pitson and B. W. Wattenberg (2010). "Intracellular localization of sphingosine kinase 1 alters access to substrate pools but does not affect the degradative fate of sphingosine-1-phosphate." J Lipid Res **51**(9): 2546-2559.

Siow, D. L. and B. W. Wattenberg (2012). "Mammalian ORMDL proteins mediate the feedback response in ceramide biosynthesis." J Biol Chem **287**(48): 40198-40204.

Siskind, L. J. and M. Colombini (2000). "The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. Implications for apoptosis." J Biol Chem **275**(49): 38640-38644.

Siskind, L. J., R. N. Kolesnick and M. Colombini (2006). "Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations." Mitochondrion **6**(3): 118-125.

Sitrin, R. G., T. M. Sassanella and H. R. Petty (2011). "An obligate role for membrane-associated neutral sphingomyelinase activity in orienting chemotactic migration of human neutrophils." Am J Respir Cell Mol Biol **44**(2): 205-212.

Skon, C. N., J. Y. Lee, K. G. Anderson, D. Masopust, K. A. Hogquist and S. C. Jameson (2013). "Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8+ T cells." Nat Immunol **14**(12): 1285-1293.

Snell, G. D., E. Russell, E. Fekete and P. Smith (1953). "Resistance of various inbred strains of mice to tumor homoiotransplants, and its relation to the H-2 allele which each carries." J Natl Cancer Inst **14**(3): 485-491.

Sofi, M. H., J. Heinrichs, M. Dany, H. Nguyen, M. Dai, D. Bastian, S. Schutt, Y. Wu, A. Daenthanasanmak, S. Gencer, A. Zivkovic, Z. Szulc, H. Stark, C. Liu, Y. J. Chang, B. Ogretmen and X. Z. Yu (2017). "Ceramide synthesis regulates T cell activity and GVHD development." JCI Insight **2**(10).

Solinas, C., L. Carbognin, P. De Silva, C. Criscitiello and M. Lambertini (2017). "Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer according to tumor subtype: Current state of the art." Breast **35**: 142-150.

Sorlie, T., C. M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, T. Thorsen, H. Quist, J. C. Matese, P. O. Brown, D. Botstein, P. E. Lonning and A. L. Borresen-Dale (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10869-10874.

Spassieva, S. D., T. D. Mullen, D. M. Townsend and L. M. Obeid (2009). "Disruption of ceramide synthesis by CerS2 down-regulation leads to autophagy and the unfolded protein response." Biochem J **424**(2): 273-283.

Stax, A. M., J. Tuengel, E. Girardi, N. Kitano, L. L. Allan, V. Liu, D. Zheng, W. J. Panenka, J. Guillaume, C. H. Wong, S. van Calenbergh, D. M. Zajonc and P. van den Elzen (2017). "Autoreactivity to Sulfatide by Human Invariant NKT Cells." *J Immunol* **199**(1): 97-106.

Stecklein, S. R., R. A. Jensen and A. Pal (2012). "Genetic and epigenetic signatures of breast cancer subtypes." *Front Biosci (Elite Ed)* **4**: 934-949.

Stephan, M., B. Edelmann, S. Winoto-Morbach, O. Janssen, U. Bertsch, C. Perrotta, S. Schutze and J. Fritsch (2017). "Role of caspases in CD95-induced biphasic activation of acid sphingomyelinase." *Oncotarget* **8**(12): 20067-20085.

Stoffel, B., P. Bauer, M. Nix, K. Deres and W. Stoffel (1998). "Ceramide-independent CD28 and TCR signaling but reduced IL-2 secretion in T cells of acid sphingomyelinase-deficient mice." *Eur J Immunol* **28**(3): 874-880.

Stover, T. and M. Kester (2003). "Liposomal delivery enhances short-chain ceramide-induced apoptosis of breast cancer cells." *J Pharmacol Exp Ther* **307**(2): 468-475.

Stover, T. C., A. Sharma, G. P. Robertson and M. Kester (2005). "Systemic delivery of liposomal short-chain ceramide limits solid tumor growth in murine models of breast adenocarcinoma." *Clin Cancer Res* **11**(9): 3465-3474.

Strub, G. M., M. Paillard, J. Liang, L. Gomez, J. C. Allegood, N. C. Hait, M. Maceyka, M. M. Price, Q. Chen, D. C. Simpson, T. Kordula, S. Milstien, E. J. Lesnefsky and S. Spiegel (2011). "Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 in mitochondria interacts with prohibitin 2 to regulate complex IV assembly and respiration." *FASEB J* **25**(2): 600-612.

Struckhoff, A. P., R. Bittman, M. E. Burow, S. Clejan, S. Elliott, T. Hammond, Y. Tang and B. S. Beckman (2004). "Novel ceramide analogs as potential chemotherapeutic agents in breast cancer." *J Pharmacol Exp Ther* **309**(2): 523-532.

Su, S., J. Liao, J. Liu, D. Huang, C. He, F. Chen, L. Yang, W. Wu, J. Chen, L. Lin, Y. Zeng, N. Ouyang, X. Cui, H. Yao, F. Su, J. D. Huang, J. Lieberman, Q. Liu and E. Song (2017). "Blocking the recruitment of naive CD4(+) T cells reverses immunosuppression in breast cancer." *Cell Res* **27**(4): 461-482.

Sugiura, M., K. Kono, H. Liu, T. Shimizugawa, H. Minekura, S. Spiegel and T. Kohama (2002). "Ceramide kinase, a novel lipid kinase. Molecular cloning and functional characterization." *J Biol Chem* **277**(26): 23294-23300.

Sukocheva, O., C. Wadham, A. Holmes, N. Albanese, E. Verrier, F. Feng, A. Bernal, C. K. Derian, A. Ullrich, M. A. Vadas and P. Xia (2006). "Estrogen transactivates EGFR via the sphingosine 1-phosphate receptor Edg-3: the role of sphingosine kinase-1." *J Cell Biol* **173**(2): 301-310.

Sukocheva, O., C. Wadham and P. Xia (2013). "Estrogen defines the dynamics and destination of transactivated EGF receptor in breast cancer cells: role of S1P(3) receptor and Cdc42." *Exp Cell Res* **319**(4): 455-465.

Sukocheva, O., L. Wang, E. Verrier, M. A. Vadas and P. Xia (2009). "Restoring endocrine response in breast cancer cells by inhibition of the sphingosine kinase-1 signaling pathway." *Endocrinology* **150**(10): 4484-4492.

Sukocheva, O. A., L. Wang, N. Albanese, S. M. Pitson, M. A. Vadas and P. Xia (2003). "Sphingosine kinase transmits estrogen signaling in human breast cancer cells." *Mol Endocrinol* **17**(10): 2002-2012.

Sumitomo, M., M. Ohba, J. Asakuma, T. Asano, T. Kuroki, T. Asano and M. Hayakawa (2002). "Protein kinase Cdelta amplifies ceramide formation via mitochondrial signaling in prostate cancer cells." *J Clin Invest* **109**(6): 827-836.

Svennerholm, L. (1994). "Designation and schematic structure of gangliosides and allied glycosphingolipids." *Prog Brain Res* **101**: XI-XIV.

T

- Taha, T. A., K. Kitatani, M. El-Alwani, J. Bielawski, Y. A. Hannun and L. M. Obeid (2006). "Loss of sphingosine kinase-1 activates the intrinsic pathway of programmed cell death: modulation of sphingolipid levels and the induction of apoptosis." *FASEB J* **20**(3): 482-484.
- Takashima, S., N. Sugimoto, N. Takuwa, Y. Okamoto, K. Yoshioka, M. Takamura, S. Takata, S. Kaneko and Y. Takuwa (2008). "G12/13 and Gq mediate S1P2-induced inhibition of Rac and migration in vascular smooth muscle in a manner dependent on Rho but not Rho kinase." *Cardiovasc Res* **79**(4): 689-697.
- Takeya, H., E. C. Gabazza, S. Aoki, H. Ueno and K. Suzuki (2003). "Synergistic effect of sphingosine 1-phosphate on thrombin-induced tissue factor expression in endothelial cells." *Blood* **102**(5): 1693-1700.
- Tanaka, A. and S. Sakaguchi (2017). "Regulatory T cells in cancer immunotherapy." *Cell Res* **27**(1): 109-118.
- Tani, M. and O. Kuge (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**(3): 328-332.
- Ternes, P., S. Franke, U. Zahringer, P. Sperling and E. Heinz (2002). "Identification and characterization of a sphingolipid delta 4-desaturase family." *J Biol Chem* **277**(28): 25512-25518.
- Theilmeyer, G., C. Schmidt, J. Herrmann, P. Keul, M. Schafers, I. Herrgott, J. Mersmann, J. Larmann, S. Hermann, J. Stypmann, O. Schober, R. Hildebrand, R. Schulz, G. Heusch, M. Haude, K. von Wnuck Lipinski, C. Herzog, M. Schmitz, R. Erbel, J. Chun and B. Levkau (2006). "High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor." *Circulation* **114**(13): 1403-1409.
- Thibaudin, M., M. Chaix, R. Boidot, F. Vegran, V. Derangere, E. Limagne, H. Berger, S. Ladoire, L. Apetoh and F. Ghiringhelli (2016). "Human ectonucleotidase-expressing CD25(high) Th17 cells accumulate in breast cancer tumors and exert immunosuppressive functions." *Oncimmunology* **5**(1): e1055444.
- Thorsson, V., D. L. Gibbs, S. D. Brown, D. Wolf, D. S. Bortone, T. H. Ou Yang, E. Porta-Pardo, G. F. Gao, C. L. Plaisier, J. A. Eddy, E. Ziv, A. C. Culhane, E. O. Paull, I. K. A. Sivakumar, A. J. Gentles, R. Malhotra, F. Farshidfar, A. Colaprico, J. S. Parker, L. E. Mose, N. S. Vo, J. Liu, Y. Liu, J. Rader, V. Dhankani, S. M. Reynolds, R. Bowlby, A. Califano, A. D. Cherniack, D. Anastassiou, D. Bedognetti, A. Rao, K. Chen, A. Krasnitz, H. Hu, T. M. Malta, H. Noushmehr, C. S. Peadarallu, S. Bullman, A. I. Ojesina, A. Lamb, W. Zhou, H. Shen, T. K. Choueiri, J. N. Weinstein, J. Guinney, J. Saltz, R. A. Holt, C. E. Rabkin, A. J. Lazar, J. S. Serody, E. G. Demicco, M. L. Disis, B. G. Vincent and L. Shmulevich (2018). "The Immune Landscape of Cancer." *Immunity* **48**(4): 812-830 e814.
- Tokuda, N., S. Numata, X. Li, T. Nomura, M. Takizawa, Y. Kondo, Y. Yamashita, N. Hashimoto, T. Kiyono, T. Urano, K. Furukawa and K. Furukawa (2013). "beta4GalT6 is involved in the synthesis of lactosylceramide with less intensity than beta4GalT5." *Glycobiology* **23**(10): 1175-1183.
- Tonnetti, L., M. C. Veri, E. Bonvini and L. D'Adamio (1999). "A role for neutral sphingomyelinase-mediated ceramide production in T cell receptor-induced apoptosis and mitogen-activated protein kinase-mediated signal transduction." *J Exp Med* **189**(10): 1581-1589.
- Trajkovic, K., C. Hsu, S. Chiantia, L. Rajendran, D. Wenzel, F. Wieland, P. Schwille, B. Brugger and M. Simons (2008). "Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes." *Science* **319**(5867): 1244-1247.

Tran, M. A., C. D. Smith, M. Kester and G. P. Robertson (2008). "Combining nanoliposomal ceramide with sorafenib synergistically inhibits melanoma and breast cancer cell survival to decrease tumor development." Clin Cancer Res **14**(11): 3571-3581.

U

Uehiro, N., R. Horii, T. Iwase, M. Tanabe, T. Sakai, H. Morizono, K. Kimura, K. Iijima, Y. Miyagi, S. Nishimura, M. Makita, Y. Ito and F. Akiyama (2013). "Validation study of the UICC TNM classification of malignant tumors, seventh edition, in breast cancer." Breast Cancer.

V

Vacaru, A. M., F. G. Tafesse, P. Ternes, V. Kondylis, M. Hermansson, J. F. Brouwers, P. Somerharju, C. Rabouille and J. C. Holthuis (2009). "Sphingomyelin synthase-related protein SMSr controls ceramide homeostasis in the ER." J Cell Biol **185**(6): 1013-1027.

Valdes-Zayas, A., Z. Gonzalez, V. Mulens, A. M. Vega, K. Perez, P. Lorenzo-Luaces, M. C. Rubio, A. Estevez, I. Curbelo, L. E. Fernandez, T. Crombet and Z. Mazorra (2017). "Immunologic Response Elicited in Breast Cancer Patients Receiving a NeuGcGM3-based Vaccine as Adjuvant Therapy." J Immunother **40**(8): 289-301.

van der Weyden, L., M. J. Arends, A. D. Campbell, T. Bald, H. Wardle-Jones, N. Griggs, M. D. Velasco-Herrera, T. Tuting, O. J. Sansom, N. A. Karp, S. Clare, D. Gleeson, E. Ryder, A. Galli, E. Tuck, E. L. Cambridge, T. Voet, I. C. Macaulay, K. Wong, P. Sanger Mouse Genetics, S. Spiegel, A. O. Speak and D. J. Adams (2017). "Genome-wide in vivo screen identifies novel host regulators of metastatic colonization." Nature **541**(7636): 233-236.

Venkataraman, K., S. Thangada, J. Michaud, M. L. Oo, Y. Ai, Y. M. Lee, M. Wu, N. S. Parikh, F. Khan, R. L. Proia and T. Hla (2006). "Extracellular export of sphingosine kinase-1a contributes to the vascular S1P gradient." Biochem J **397**(3): 461-471.

Verderio, C., M. Gabrielli and P. Giussani (2018). "Role of sphingolipids in the biogenesis and biological activity of extracellular vesicles." J Lipid Res **59**(8): 1325-1340.

Vethakanraj, H. S., T. A. Babu, G. B. Sudarsanan, P. K. Duraisamy and S. Ashok Kumar (2015). "Targeting ceramide metabolic pathway induces apoptosis in human breast cancer cell lines." Biochem Biophys Res Commun **464**(3): 833-839.

von Gerichten, J., K. Schlosser, D. Lamprecht, I. Morace, M. Eckhardt, D. Wachten, R. Jennemann, H. J. Grone, M. Mack and R. Sandhoff (2017). "Diastereomer-specific quantification of bioactive hexosylceramides from bacteria and mammals." J Lipid Res **58**(6): 1247-1258.

Vonderheide, R. H., S. M. Domchek and A. S. Clark (2017). "Immunotherapy for Breast Cancer: What Are We Missing?" Clin Cancer Res **23**(11): 2640-2646.

W

Walzer, T., L. Chiossone, J. Chaix, A. Calver, C. Carozzo, L. Garrigue-Antar, Y. Jacques, M. Baratin, E. Tomasello and E. Vivier (2007). "Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor." Nat Immunol **8**(12): 1337-1344.

Wang, W., M. H. Graeler and E. J. Goetzl (2005). "Type 4 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor (S1P4) transduces S1P effects on T cell proliferation and cytokine secretion without signaling migration." FASEB J **19**(12): 1731-1733.

Wang, Y. C., C. F. Tsai, H. L. Chuang, Y. C. Chang, H. S. Chen, J. N. Lee and E. M. Tsai (2016). "Benzyl butyl phthalate promotes breast cancer stem cell expansion via SPHK1/S1P/S1PR3 signaling." Oncotarget **7**(20): 29563-29576.

- Wang, Z. Q., K. Milne, H. Derocher, J. R. Webb, B. H. Nelson and P. H. Watson (2016). "CD103 and Intratumoral Immune Response in Breast Cancer." *Clin Cancer Res* **22**(24): 6290-6297.
- Watson, C., J. S. Long, C. Orange, C. L. Tannahill, E. Mallon, L. M. McGlynn, S. Pyne, N. J. Pyne and J. Edwards (2010). "High expression of sphingosine 1-phosphate receptors, S1P1 and S1P3, sphingosine kinase 1, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 is associated with development of tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer patients." *Am J Pathol* **177**(5): 2205-2215.
- Weber, J. P., F. Fuhrmann, R. K. Feist, A. Lahmann, M. S. Al Baz, L. J. Gentz, D. Vu Van, H. W. Mages, C. Haftmann, R. Riedel, J. R. Grun, W. Schuh, R. A. Kroczeck, A. Radbruch, M. F. Mashreghi and A. Hutloff (2015). "ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Kruppel-like factor 2." *J Exp Med* **212**(2): 217-233.
- Wegner, M. S., R. A. Wanger, S. Oertel, S. Brachtendorf, D. Hartmann, S. Schiffmann, R. Marschalek, Y. Schreiber, N. Ferreiros, G. Geisslinger and S. Grosch (2014). "Ceramide synthases CerS4 and CerS5 are upregulated by 17beta-estradiol and GPER1 via AP-1 in human breast cancer cells." *Biochem Pharmacol* **92**(4): 577-589.
- Weichand, B., R. Popp, S. Dziumbila, J. Mora, E. Strack, E. Elwakeel, A. C. Frank, K. Scholich, S. Pierre, S. N. Syed, C. Olesch, J. Ringleb, B. Oren, C. Doring, R. Savai, M. Jung, A. von Knethen, B. Levkau, I. Fleming, A. Weigert and B. Brune (2017). "S1PR1 on tumor-associated macrophages promotes lymphangiogenesis and metastasis via NLRP3/IL-1beta." *J Exp Med* **214**(9): 2695-2713.
- Weir, J. M., G. Wong, C. K. Barlow, M. A. Greeve, A. Kowalczyk, L. Almasy, A. G. Comuzzie, M. C. Mahaney, J. B. Jowett, J. Shaw, J. E. Curran, J. Blangero and P. J. Meikle (2013). "Plasma lipid profiling in a large population-based cohort." *J Lipid Res* **54**(10): 2898-2908.
- West, N. R., S. E. Kost, S. D. Martin, K. Milne, R. J. Deleeuw, B. H. Nelson and P. H. Watson (2013). "Tumour-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer." *Br J Cancer* **108**(1): 155-162.
- Wolff, A. C., M. E. H. Hammond, K. H. Allison, B. E. Harvey, L. M. McShane and M. Dowsett (2018). "HER2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update Summary." *J Oncol Pract* **14**(7): 437-441.
- Woo, S. M., B. R. Seo, K. J. Min and T. K. Kwon (2015). "FTY720 enhances TRAIL-mediated apoptosis by up-regulating DR5 and down-regulating Mcl-1 in cancer cells." *Oncotarget* **6**(13): 11614-11626.

X

- Xu, L., W. Xu, S. Qiu and S. Xiong (2010). "Enrichment of CCR6+Foxp3+ regulatory T cells in the tumor mass correlates with impaired CD8+ T cell function and poor prognosis of breast cancer." *Clin Immunol* **135**(3): 466-475.

Y

- Yamashita, Y., S. Nishiumi, S. Kono, S. Takao, T. Azuma and M. Yoshida (2017). "Differences in elongation of very long chain fatty acids and fatty acid metabolism between triple-negative and hormone receptor-positive breast cancer." *BMC Cancer* **17**(1): 589.
- Yang, L., L. Y. Zheng, Y. Tian, Z. Q. Zhang, W. L. Dong, X. F. Wang, X. Y. Zhang and C. Cao (2015). "C6 ceramide dramatically enhances docetaxel-induced growth inhibition and apoptosis in cultured breast cancer cells: a mechanism study." *Exp Cell Res* **332**(1): 47-59.

Yeang, C., S. Varshney, R. Wang, Y. Zhang, D. Ye and X. C. Jiang (2008). "The domain responsible for sphingomyelin synthase (SMS) activity." Biochim Biophys Acta **1781**(10): 610-617.

Yeong, J., A. A. Thike, J. C. Lim, B. Lee, H. Li, S. C. Wong, S. S. Hue, P. H. Tan and J. Iqbal (2017). "Higher densities of Foxp3(+) regulatory T cells are associated with better prognosis in triple-negative breast cancer." Breast Cancer Res Treat **163**(1): 21-35.

Yoon, C. M., B. S. Hong, H. G. Moon, S. Lim, P. G. Suh, Y. K. Kim, C. B. Chae and Y. S. Gho (2008). "Sphingosine-1-phosphate promotes lymphangiogenesis by stimulating S1P1/Gi/PLC/Ca²⁺ signaling pathways." Blood **112**(4): 1129-1138.

Yoon, G., K. O. Kim, J. Lee, D. Kwon, J. S. Shin, S. J. Kim and I. H. Choi (2002). "Ceramide increases Fas-mediated apoptosis in glioblastoma cells through FLIP down-regulation." J Neurooncol **60**(2): 135-141.

Z

Zamora-Pineda, J., A. Kumar, J. H. Suh, M. Zhang and J. D. Saba (2016). "Dendritic cell sphingosine-1-phosphate lyase regulates thymic egress." J Exp Med **213**(12): 2773-2791.

Zhang, L., M. Zeng and B. M. Fu (2017). "Sphingosine-1-phosphate reduces adhesion of malignant mammary tumor cells MDA-MB-231 to microvessel walls by protecting endothelial surface glycocalyx." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **63**(4): 16-22.

Zhang, Q., J. Qin, L. Zhong, L. Gong, B. Zhang, Y. Zhang and W. Q. Gao (2015). "CCL5-Mediated Th2 Immune Polarization Promotes Metastasis in Luminal Breast Cancer." Cancer Res **75**(20): 4312-4321.

Zhang, X., K. Kitatani, M. Toyoshima, M. Ishibashi, T. Usui, J. Minato, M. Egiz, S. Shigeta, T. Fox, T. Deering, M. Kester and N. Yaegashi (2018). "Ceramide Nanoliposomes as a MLKL-Dependent, Necroptosis-Inducing, Chemotherapeutic Reagent in Ovarian Cancer." Mol Cancer Ther **17**(1): 50-59.

Zhao, L., P. Yue, F. R. Khuri and S. Y. Sun (2013). "mTOR complex 2 is involved in regulation of Cbl-dependent c-FLIP degradation and sensitivity of TRAIL-induced apoptosis." Cancer Res **73**(6): 1946-1957.

Zhou, J. and J. D. Saba (1998). "Identification of the first mammalian sphingosine phosphate lyase gene and its functional expression in yeast." Biochem Biophys Res Commun **242**(3): 502-507.

Zhou, Y., M. S. Salker, B. Walker, P. Munzer, O. Borst, M. Gawaz, E. Gulbins, Y. Singh and F. Lang (2016). "Acid Sphingomyelinase (ASM) is a Negative Regulator of Regulatory T Cell (Treg) Development." Cell Physiol Biochem **39**(3): 985-995.

Zhu, Y. J., H. You, J. X. Tan, F. Li, Z. Qiu, H. Z. Li, H. Y. Huang, K. Zheng and G. S. Ren (2017). "Overexpression of sphingosine kinase 1 is predictive of poor prognosis in human breast cancer." Oncol Lett **14**(1): 63-72.

ANNEXES

Annexe 1

Classification TNM du cancer du sein, 8^{ème} édition, 2018, et stade UICC

Le système TNM distingue le stade clinique pré-thérapeutique noté "cTNM" et le stade anatomopathologique postchirurgical noté "pTNM"

Tumeur Primaire T

Tx : la tumeur primitive ne peut pas être évaluée

T0 : la tumeur primitive n'est pas palpable

- Tis : carcinome *in situ*
- Tis (DCIS) : carcinome canalaire *in situ*
- Tis (CLIS) : carcinome lobulaire *in situ*
- Tis (Paget) : maladie de Paget du mamelon sans tumeur sous-jacente
- NB : la maladie de Paget associée à une tumeur est classée en fonction de la taille de la tumeur

T1 : tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension

T1mic : micro-invasion ≤ 1 mm dans sa plus grande dimension

- T1mi : tumeur ≤ 1 mm dans sa plus grande dimension
- T1a : $1 \text{ mm} < \text{tumeur} \leq 5 \text{ mm}$ dans sa plus grande dimension
- T1b : $5 \text{ mm} < \text{tumeur} \leq 1 \text{ cm}$ dans sa plus grande dimension
- T1c : $1 \text{ cm} < \text{tumeur} \leq 2 \text{ cm}$ dans sa plus grande dimension

T2 : $2 \text{ cm} < \text{tumeur} \leq 5 \text{ cm}$ dans sa plus grande dimension

T3 : tumeur > 5 cm dans sa plus grande dimension

T4 : tumeur, quelle que soit sa taille, avec une extension directe soit à la paroi thoracique (a), soit à la peau (b)

- T4a : extension à la paroi thoracique en excluant le muscle pectoral
- T4b : œdème (y compris peau d'orange) ou ulcération de la peau du sein, ou nodules de perméation situés sur la peau du même sein
- T4c : T4a + T4b
- T4d : cancer inflammatoire

Ganglions lymphatiques régionaux pN

Nx : l'envahissement des ganglions lymphatiques régionaux ne peut pas être évalué (par exemple déjà enlevés chirurgicalement ou non disponibles pour l'analyse anatomopathologique du fait de l'absence d'évidement)

N0 : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique et absence d'examen complémentaire à la recherche de cellules tumorales isolées

- Nx : l'envahissement ganglionnaire régional n'a pas pu être évalué
- N0 (i+) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, IHC positive, avec des amas cellulaires $\leq 0,2$ mm (considéré comme sans métastase ganglionnaire)
- N0 (mol+) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, biologie moléculaire positive (RT-PCR)

N1mi : micrométastases $> 0,2$ mm et ≤ 2 mm

N1 : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires ou/et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique

- N1mi : micrométastases (environ 200 cellules, > 0,2mm mais ≤ 2mm)
- N1a : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires, 1 métastase au moins > 2mm
- N1b : envahissement détecté sur le ganglion sentinelle mammaire interne homolatéral sans cellules tumorales isolées
- N1c : pN1a + pN1b

N2 : envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire

- N2a : envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires avec au moins un amas cellulaire > 2 mm
- N2b : envahissement du ganglion sentinelle mammaire interne homolatéral suspect, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire

N3 : envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions sous-claviculaires (niveau III axillaire)

ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire

ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et micro ou macrométastase sur le ganglion sentinelle sans signe clinique

ou envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux

- N3a : envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires (avec au moins un amas cellulaire > 2 mm) ou envahissement des ganglions sous-claviculaires
- N3b : N1a ou N2a + N2b
ou N2a + N1b
- N3c : envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux

Métastases à distance (M)

- M0 : absence de métastases à distance
- M0 (i+) : absence de métastases à distance sur l'imagerie mais présence d'un amas de cellules tumorale plus petit 0.2mm dans le sang, la moelle ou un ganglion non régional sans signes cliniques de métastases
- M1 : présence de métastase(s) à distance

Classification par stade UICC

0	Tis N0 M0
IA	T1 N0 M0
IB	T0 N1mi M0 ; T1 N1mi M0
IIA	T0 N1 M0 ; T1 N1 M0 ; T2 N0 M0 ;
IIB	T2 N1 M0 ; T3 N0 M0
IIIA	T0 N2 M0 ; T1 N2 M0 ; T2 N2 M0 ; T3 N1 M0 ; T3 N2 M0
IIIB	T4 N0 M0 ; T4 N1 M0 ; T4 N2 M0
IIIC	Tous T N3 M0
IV	Tous T Tous N M1

Annexe 2**Liste des anticorps et clones utilisés**

Epitope	Clone	Conjugaison	Fournisseur
CD45	HI30	BUV395	BD Bioscience
CD3	UCHT1	BUV496	BD Bioscience
CD8	SK1	BV605	BD Bioscience
CD4	RPAT4	APC-H7	BD Bioscience
CD45RA	HI100	BV605	BD Bioscience
CCR7	G043H7	AF 488	Biolegend
CD45RO	UCHL1	PE-Cy7	BD Bioscience
CCR4	1G1	BV421	Biolegend
CXCR3	1C6	AF 488	Biolegend
CCR6	11A9	PE-Cy7	Biolegend
FOXP3	PCH101	PE	eBioscience
Granzyme B	GB11	PE	BD Bioscience
CD27	M-T271	BV421	BD Bioscience
CD27	M-T271	PE-CF594	BD Bioscience
CD103	Ber-ACT8	BV421	BD Bioscience
Live		Aqua	Invitrogen
S1P1	SW4GYPP	APC	eBioscience
Contrôle isotypique	P3.6.2.8.1	APC	eBioscience

Annexe 3

Proportion relative des différentes espèces de sphingolipides entre les différents types de cancer du sein

Proportion relative des différentes sous-espèces de Céramide

Cer (%)	Median (Min-Max)			p value		
	RH+HER2-	HER2+	TNBC	RH+HER2- vs TNBC	HER2+ vs TNBC	RH+HER2- vs HER2+
C14:0	1.32 (0.35-2.86)	1.44 (0.7-2.81)	1.43 (0.88-2.05)	1	1	1
C14:1	0.51 (0-1)	0.45 (0.26-0.94)	0.46 (0.23-1.07)	1	1	0.8601
C16:0	23.51 (5.32-39.75)	21.95 (11.62-35.55)	15.56 (10.6-24.18)	0.002	0.0168	1
C16:1	2.5 (0-4.91)	2.35 (1.3-3.69)	2.03 (0-3.31)	0.5444	1	1
C18:0	3.71 (1.58-11.13)	3.76 (1.15-7.02)	3.33 (0.57-7.94)	0.3487	0.5082	1
C18:1	1.17 (0.44-2.7)	0.95 (0.43-2.46)	0.72 (0.38-1.85)	0.0912	0.8399	0.484
C20:0	3.2 (2.09-5.47)	2.75 (1.63-6.86)	2.3 (0.98-6.57)	0.1729	0.6596	1
C20:1	1.09 (0.48-2.92)	0.75 (0.41-1.59)	0.65 (0.21-1.95)	0.1267	1	0.512
C22:0	8.9 (5.05-15.15)	8.61 (5.24-13.85)	9.68 (7.76-15.32)	0.6359	0.6596	1
C22:1	3.47 (2.22-9.23)	3.96 (2.74-5.09)	3.26 (1.82-6.8)	1	1	1
C24:0	11.34 (5.7-19.65)	14.36 (4.77-23.33)	20.71 (8.64-37.69)	0.0004	0.058	0.512
C24:1	30.33 (14.69-38.91)	30.2 (20.93-41.12)	29.91 (26.91-35.67)	1	1	1
C24:2	7.56 (3.83-13.91)	6.07 (3.83-9.09)	6.5 (4.22-9.05)	0.3266	1	0.2623

Proportion relative des différentes sous-espèces de Sphingomyéline

SM (%)	Median (Min-Max)			p value		
	RH+HER2-	HER2+	TNBC	RH+HER2- vs TNBC	HER2+ vs TNBC	RH+HER2- vs HER2+
C14:0	2.83 (1.54-5.06)	3.53 (1.72-6.23)	3.35 (2.27-7.9)	0.0246	1	0.2144
C14:1	0.09 (0-0.24)	0.07 (0-0.21)	0.13 (0-0.36)	0.2093	0.3277	1
C16:0	38.76 (20.72-47.93)	32.68 (26.39-48.45)	28.74 (20.76-41.91)	0.0034	0.0168	0.3387
C16:1	1.98 (0.93-3.93)	2.15 (1.43-3.95)	2.9 (1.09-6.51)	0.1603	1	0.6363
C18:0	5.3 (3.12-9.68)	4.13 (2.93-6.61)	4.94 (2.11-8.42)	1	1	0.1737
C18:1	0.88 (0.42-2.05)	0.69 (0.55-1.38)	0.8 (0.54-2.49)	1	0.9065	0.4312
C20:0	2.91 (1.95-8.93)	2.89 (2.09-5.06)	2.93 (1.44-5.28)	1	1	1
C20:1	0.74 (0.28-3.99)	0.52 (0.33-1.09)	0.57 (0.39-1.84)	1	0.7765	0.8601
C22:0	7.93 (5.84-13.25)	8.45 (6.82-11.58)	9.96 (5.11-13.21)	0.0837	0.1445	1
C22:1	2.18 (0.01-4.54)	2.17 (1.7-3.41)	2.41 (0.01-5.36)	1	1	1
C24:0	12.3 (8.57-21.38)	15.66 (10.7-23.1)	17.92 (11.72-26.92)	0.0246	1	0.1737
C24:1	18.5 (13.31-22.35)	18.03 (14.05-23.89)	17.71 (14.53-20.33)	0.7091	1	1
C24:2	3.06 (0.64-9.05)	3.5 (1.36-8.83)	5.51 (0.81-8.69)	0.1864	0.7165	1
C24:3	0.38 (0.16-0.97)	0.43 (0.22-0.61)	0.52 (0.29-0.7)	0.0179	0.0873	1

Proportion relative des différentes espèces de monohéxosylcéramide

HexCer (%)	Median (Min-Max)			p value		
	RH+HER2-	HER2+	TNBC	RH+HER2- vs TNBC	HER2+ vs TNBC	RH+HER2- vs HER2+
C16:0	19.8 (3.19-48.95)	17.54 (5.94-29.61)	12.08 (5.96-22.11)	0.02	0.1628	0.9893
C18:0	3.94 (1.72-8.96)	2.59 (0.92-5.02)	1.69 (0.81-4.22)	0.002	0.6596	0.111
C20:0	5.53 (2.72-12.65)	3.76 (1.34-6.9)	2.38 (0.91-6.93)	0.0007	0.3836	0.1199
C22:0	21.3 (10.93-38.17)	19.38 (9.94-30.73)	15.01 (9.1-31.27)	0.0222	0.1445	1
C24:0	17.65 (7.47-45.51)	28.53 (14.19-39.41)	35.39 (18.43-67.77)	0.0007	0.2288	0.0443
C24:1	21.54 (9.03-38)	22.35 (13.84-42.09)	21.67 (12.63-30.88)	1	1	1
C24:2	3.51 (0-14.26)	3.96 (0-9.29)	5.33 (0-11.96)	1	1	1

Proportion relative des différentes espèces de Lacotsylcéramide

LacCer (%)	Median (Min-Max)			p value		
	RH+HER2-	HER2+	TNBC	RH+HER2- vs TNBC	HER2+ vs TNBC	RH+HER2- vs HER2+
C14:0	5.01 (1.3-9.4)	5.74 (2.29-7.65)	4.03 (2.42-6.74)	0.6718	0.3143	1
C16:0	29.63 (6.71-45.99)	29.36 (16.7-36.24)	22.93 (10.02-32.4)	0.02	0.113	1
C18:0	3.97 (2.11-10.47)	2.79 (1.2-4.45)	2.24 (1.07-5.24)	0.0003	0.7765	0.0057
C20:0	5.04 (2.1-11.18)	2.65 (1.07-4.31)	2.05 (0.82-9.61)	0.0001	0.6596	0.0019
C22:0	8.07 (3.2-17.96)	5.98 (3.57-19.78)	8.47 (3.39-19.03)	1	0.5556	0.3603
C24:0	19.31 (10.69-43.45)	24.49 (13.54-42.77)	31.17 (12.41-55.55)	0.0405	0.5556	0.4312
C24:1	25.91 (12.97-33.18)	29.4 (17.03-38.1)	26.01 (18.37-42.95)	1	1	0.2986

Proportion relative des différentes espèces de Dihydrocéramide

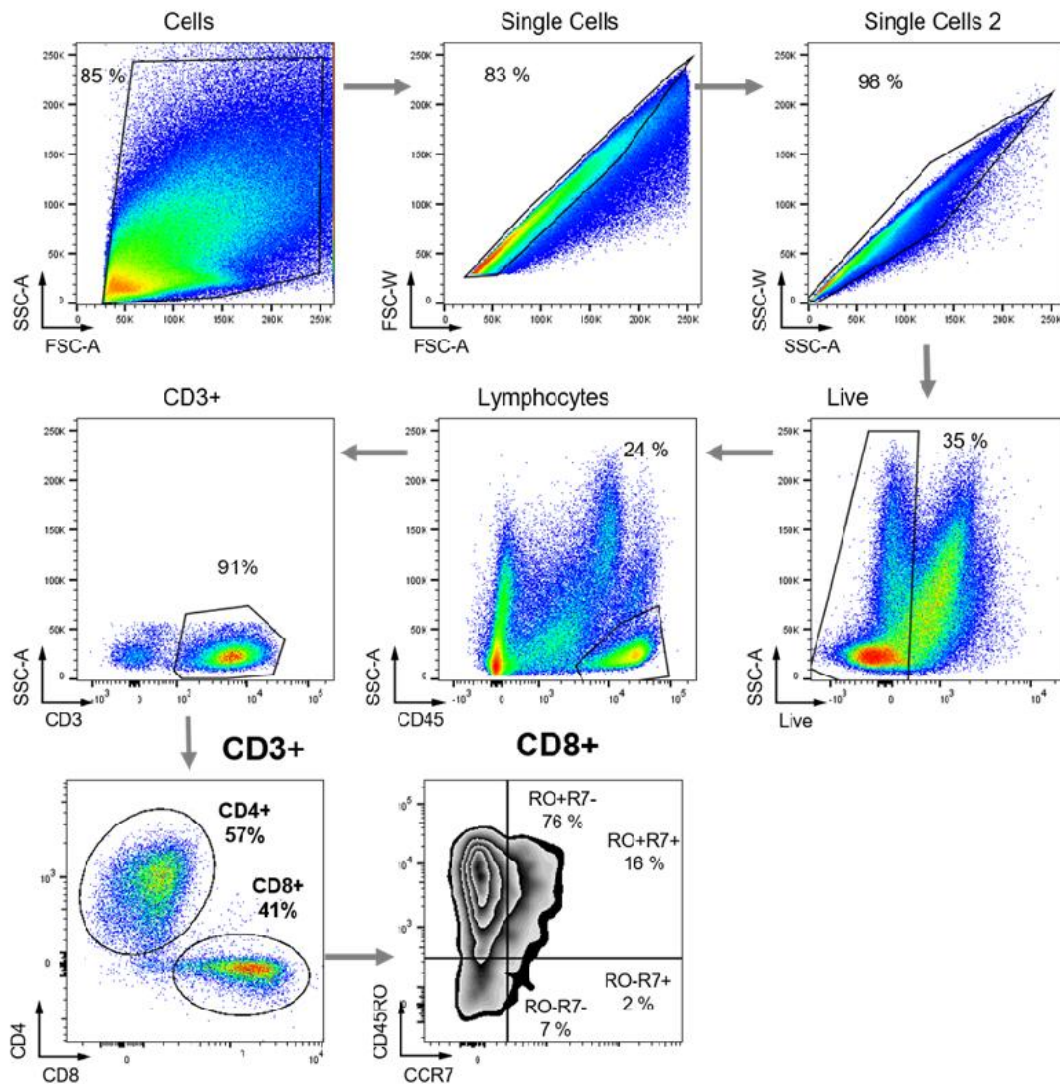
dhCer (%)	Median (Min-Max)			p value		
	RH+HER2-	HER2+	TNBC	RH+HER2- vs TNBC	HER2+ vs TNBC	RH+HER2- vs HER2+
C14:0	2.2 (0.53-3.91)	2.21 (0.71-4.83)	1.49 (0.49-5.16)	0.4485	0.1445	1
C16:0	48.49 (22.66-56.19)	43.8 (32.01-54.53)	29.04 (13.45-50.83)	0.001	0.0016	1
C18:0	9.7 (5.16-18.92)	8.48 (2.72-12.81)	7.29 (3.98-11.89)	0.0129	0.7165	0.2986
C20:0	4.52 (1.95-11.28)	5.04 (1.49-6.44)	3.03 (1.85-5.1)	0.0445	0.0667	1
C22:0	13.48 (8.44-25.18)	14.24 (11.01-22.38)	17.49 (14.31-23.77)	0.0144	0.0068	1
C24:0	19.82 (8.94-46.71)	23.34 (13.75-44.98)	39.64 (15.76-59.05)	0.002	0.0141	1

Proportion relative des différentes espèces de Dihydrosphingomyéline

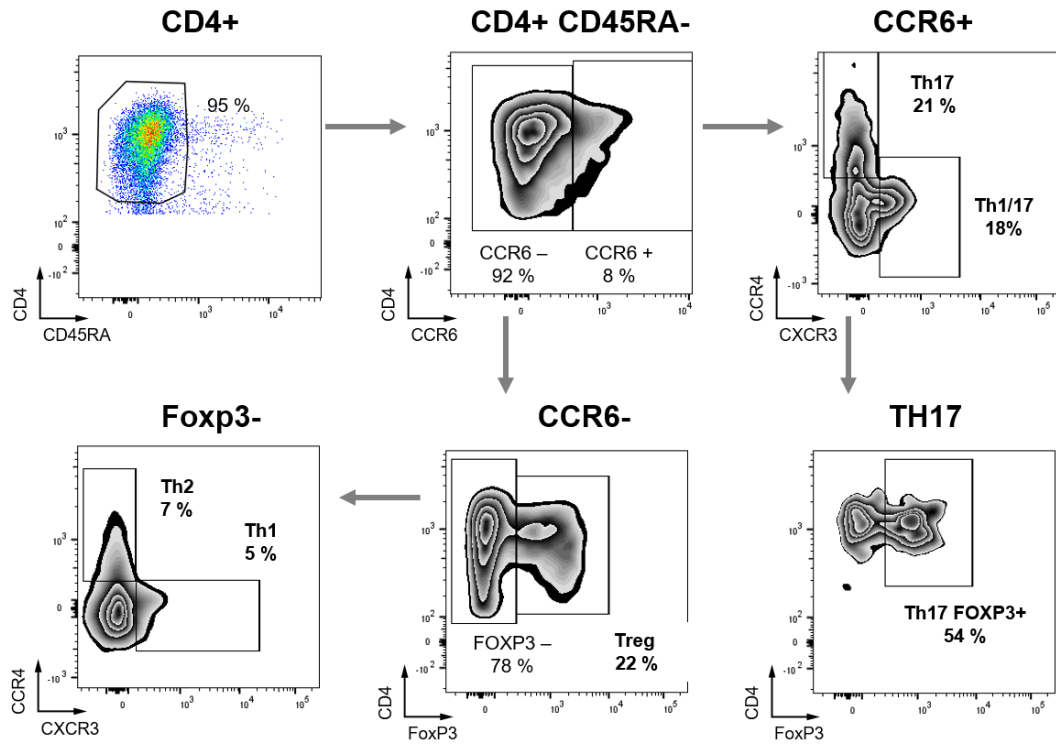
dhSM (%)	Median (Min-Max)			p value		
	RH+HER2-	HER2+	TNBC	RH+HER2- vs TNBC	HER2+ vs TNBC	RH+HER2- vs HER2+
C14:0	1.73 (0.64-5.81)	1.67 (0.98-3.2)	1.76 (1.25-2.68)	1	1	1
C16:0	55.32 (21.49-76.51)	60.43 (46.53-76.41)	49.91 (42.74-59.36)	0.2007	0.0025	0.2144
C18:0	7.44 (3.38-17)	5.09 (2.66-9.65)	5.39 (3.32-7.83)	0.0129	1	0.0278
C20:0	2.53 (1.43-8.31)	2.09 (1.31-5.09)	2.36 (1.53-3.85)	0.4485	1	0.28
C22:0	7.02 (2.45-13.89)	6.75 (4.02-9)	8.58 (7.46-13.52)	0.0144	0.0016	1
C24:0	5.43 (0.97-30.2)	5.89 (3.07-16.47)	14.44 (5.47-23.1)	0.0008	0.0038	1
C24:1	15.76 (6.47-29.53)	12.34 (6.49-35.28)	15.01 (12.12-26.6)	1	0.1445	1

Annexe 4

Stratégie d'analyses des sous-populations de TIL par cytométrie en flux



Analyse par cytométrie en flux des marquages lymphocytaires avec le premier panel d'anticorps. Stratégie d'analyse du panel d'anticorps pour l'étude des lymphocytes T CD8⁺. L'exclusion des doublets est réalisée sur 2 fenêtres successives avec l'aire et la largeur des paramètres non fluorescents. Les cellules mortes sont éliminées avec le marqueur de viabilité et un premier fenêtrage des lymphocytes est réalisé avec le CD45. Les lymphocytes T sont repérés avec le marqueur CD3 et les T CD4⁺ et CD8⁺ sont aussi séparée sur un autre histogramme. Les populations CD8⁺ naïves, CM, EM, EMRA sont séparées avec CD45RO et CCR7.



Analyse par cytométrie en flux des marquages lymphocytaires avec le deuxième panel d'anticorps. La même stratégie que pour le premier panel est utilisée pour analyser les lymphocytes T CD4⁺. Les populations CD4⁺ mémoires sont toutes séparées avec les marquages des récepteurs aux chimiokines CCR4, CCR6, CXCR3 et du facteur de transcription FoxP3.

AUTEUR : Michaël Pérès

TITRE : Caractérisation d'une signature sphingolipidique d'immunoéchappement dans le cancer du sein triple négatif

DIRECTEURS DE THESE : Pr Bruno Ségui et Dr Céline Colacios

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Toulouse, le Mercredi 12 Décembre 2018

RESUME

Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent et celui qui cause le plus de décès dans le monde. Il existe plusieurs types de cancer du sein qui diffèrent par l'expression des récepteurs aux œstrogènes, à la progestérone et du récepteur HER2. Le cancer du sein dit triple négatif (TNBC) n'exprime aucun de ces récepteurs. Le métabolisme des sphingolipides (SL) est fréquemment altéré dans les cancers du sein et semble participer à la progression tumorale. Tandis que les SL ont été décrits comme modulateurs des réponses immunitaires dans des modèles précliniques de cancer, il n'existe pas à ce jour d'étude chez l'Homme évaluant l'impact des altérations du métabolisme des SL sur le développement tumoral et la réponse immunitaire associée. Dans ce contexte, l'objectif de nos travaux est double. **Le premier objectif** est de caractériser une signature sphingolipidique dans des biopsies de tumeurs mammaires humaines de divers sous-types histologiques. Une analyse par spectrométrie de masse à haute résolution nous a permis d'identifier dans les TNBC des taux élevés de SL en -C24:0, qui pourraient constituer des biomarqueurs potentiels pour ce type de cancer. **Le deuxième objectif** est d'établir une signature sphingolipidique associée à la réponse immunitaire dans le cancer du sein. Nous avons analysé les lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) par cytométrie en flux et par immunohistochimie dans nos échantillons tumoraux. Ces analyses nous ont permis de montrer que, dans les TNBC, les taux de C16:0-céramide sont corrélés positivement avec la proportion de TIL CD8⁺ et négativement avec celle des Treg FoxP3⁺. Afin d'évaluer l'influence potentielle des SL sur la topologie d'infiltration des lymphocytes (intratumoral *versus* adjacent), nous avons aussi comparé les taux de SL dans les tumeurs ayant une forte ou une faible proportion de lymphocytes T CD8⁺ intratumoraux. Nous avons observé notamment des taux élevés de sphingosine-1-phosphate (S1P) dans les tumeurs faiblement infiltrées par les lymphocytes T CD8⁺ intratumoraux. Nos observations suggèrent que la production de C16:0-céramide soit en faveur d'un recrutement préférentiel des lymphocytes T CD8⁺ dans les TNBC, tandis que la S1P pourrait être un facteur d'immunoéchappement, impactant négativement sur la topologie des TIL CD8⁺ dans les tumeurs mammaires. L'ensemble de nos travaux indique que certains SL pourraient constituer des biomarqueurs originaux de TNBC. De plus, la reprogrammation de ce métabolisme pourrait augmenter (i) quantitativement et qualitativement l'infiltration intratumorale des lymphocytes, et (ii) potentiellement l'efficacité des immunothérapies dans le cancer du sein.

MOT CLES : sphingolipides, cancer du sein, lymphocytes T, réponse immunitaire

DISCIPLINE : Immunologie

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE : UMR1037 INSERM CRCT Equipe 4
"métabolisme des sphingolipides, mort cellulaire et progression tumorale", 2 avenue Hubert Curien, 31100 Toulouse