HAL open science

# Rôle des sphingolipides dans la cancérogenèse : l'exemple de la maladie de Gaucher

Leonardo Astudillo

**To cite this version:**

Leonardo Astudillo. Rôle des sphingolipides dans la cancérogenèse : l'exemple de la maladie de Gaucher. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT : 2016TOU30401 . tel-02980654

**HAL Id: tel-02980654**

**https://theses.hal.science/tel-02980654v1**

Submitted on 27 Oct 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.

Université de Toulouse

# THESE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par** *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
**Spécialité** : Physiopathologie

Présentée et soutenue par **Leonardo ASTUDILLO**
Le 24 novembre 2016

# RÔLE DES SPHINGOLIPIDES DANS LA CANCEROGENESE : L'EXEMPLE DE LA MALADIE DE GAUCHER

**Les membres du jury :**

**Mme Laurence LAMANT** — **Présidente du jury**
Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse III

**M. Marc G. BERGER** — **Rapporteur**
Professeur, Université Clermond Ferrand

**M. Christian ROSE** — **Rapporteur**
Professeur, Université Catholique de Lille

**M. Jérôme STIRNEMANN** — **Examinateur**
Docteur, Privat Docent, Université de Genève

**M Thierry LEVADE** — **Examinateur**
Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse III

**Directeur de thèse :**

**M. Thierry LEVADE**
Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse III

**Ecole doctorale :** *Biologie, Santé, Biotechnologies*
INSERM UMR1037, CRCT (Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse),
Oncopole de Toulouse, 2, avenue Hubert Curien, CS 53717, 31037 Toulouse cedex 1

**UNIVERSITE PAUL SABATIER – TOULOUSE III**
U.F.R Sciences de la Vie et de la Terre

**THESE**

En vue de l'obtention du
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE**
**Délivré par l'Université Toulouse III-Paul Sabatier**

**Spécialité : Physiopathologie**

Présentée par

**Leonardo ASTUDILLO**

# RÔLE DES SPHINGOLIPIDES DANS LA CANCEROGENESE : L'EXEMPLE DE LA MALADIE DE GAUCHER

**Soutenue le devant le jury :**

**M. Marc G. BERGER** **Rapporteur**
Professeur, Université Clermond Ferrand

**M. Christian ROSE** **Rapporteur**
Professeur, Université Catholique de Lille

**M. Jerome STIRNEMANN** **Examinateur**
Docteur, Privat Docent, Université de Genève

**Directeur de thèse :**

**M. Thierry LEVADE**
Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse III

INSERM UMR1037, CRCT (Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse), Oncopole de Toulouse, 2, avenue Hubert Curien, CS 53717, 31037 Toulouse cedex 1

**Remerciements**

Je voudrais tout d'abord remercier le professeur Levade de m'avoir accueilli dans son unité de recherche et de m'avoir permis de travailler sur une thématique en rapport avec une partie de mon activité clinique. J'ai toujours été impressionné par votre connaissance encyclopédique de la médecine et des sciences, qui n'a d'égale que votre modestie. J'ai beaucoup appris de nos échanges et de vos réflexions toujours très pertinentes.

Je voudrais ensuite remercier Nicole Therville, pour tout ce qu'elle m'a appris toutes ces années passées ensemble sur cette thématique, et toute l'aide qu'elle m'a apportée et tout le travail important qu'elle a réalisé et qui a permis que nos résultats ressemblent à quelque chose. J'ai vraiment beaucoup regretté ton départ de l'équipe. J'ai toujours apprécié nos discussions sur la vie.

Je voudrais remercier ensuite Virginie Garcia, car nous étions ensemble avec Nicole emprisonnés dans notre aquarium… Je la remercie également de tout ce qu'elle m'a appris.

Je remercie également Céline Colacios, arrivée sur la fin de notre thématique dans l'équipe mais qui par son esprit scientifique et sa sagacité a été d'une aide également précieuse. Merci également de m'avoir fourni un nouveau correspondant…

Je voudrais enfin bien sur remercier le Pr Bruno Ségui, le Dr Nathalie Andrieu-Abadie, et le Dr Frédérique Sabourdy pour m'avoir accepté dans leur équipe et d'avoir toujours été à l'écoute de tous les problèmes qui sont apparus au cours de notre recherche.

Je voudrais également remercier toutes les personnes de l'équipe que j'ai connues pendant ma thèse ainsi que les étudiants : le Pr Hervé Benoist, Stéphane Carpentier, Patricia Clavé, David Garandeau, Bertrand Florie, Carmen Bedia, Virginie Albinet, Elodie Lafont, Marie-lise Bats, Anne Monfort, Marguerite Mrad.

Je remercie toutes les personnes de l'équipe qui m'ont permis d'apprendre de nouvelles choses…

J'ai vraiment trouvé dans la recherche médicale, un épanouissement personnel intellectuel. Cependant, la recherche c'est difficile. On cherche la pépite d'or et on tamise, on tamise, parfois dans des endroits où il n'y a pas d'or…
De plus, quand on fait de la clinique et à la fois de la recherche, quand on est la moitié du temps au labo et l'autre moitié à l'hôpital : pour les uns, on n'est pas assez là et pour les autres, c'est pareil…

Je voudrais enfin remercier toutes les personnes qui m'ont soutenues pendant ces années.

Je voudrais dédier ma thèse à mes enfants, Camille, Marco et Vénitia et à celle qui partage ma vie, Anne.

**RESUME**

Les sphingolipides représentent une classe majeure de lipides qui sont des constituants de toutes les cellules eucaryotes. Ils sont des effecteurs bioactifs impliqués dans les fonctions clés cellulaires comme la différenciation, la prolifération, la motilité, l'apoptose et la sénescence. De plus, leur rôle dans le cancer est maintenant bien établi pour de nombreux sphingolipides. La maladie de Gaucher (MG) est une lipidose héréditaire, à transmission autosomique récessive, due à un déficit enzymatique en glucocérébrosidase (béta-glucosidase acide, codée par le gène *GBA1*). Cette enzyme est une des différentes enzymes participant au métabolisme des sphingolipides : elle permet la dégradation du glucosylcéramide (GlcCer) en céramide. La MG est caractérisée par une surcharge en GlcCer dans les cellules du système réticulo-endothélial du foie, de la rate et de la moelle osseuse (cellules de Gaucher). Ces dernières années ont permis de montrer qu'il existe une surreprésentation de divers cancers, tels que le myélome multiple et le mélanome, dans la MG. Les mécanismes impliqués ne sont cependant pas connus.

L'objectif de ces travaux de thèse est de comprendre la survenue des cancers dans la MG. Nous avons pour cela développé un modèle de cancérogenèse dans la MG en utilisant des modèles murins pour rechercher un effet favorisant du microenvironnement de la MG sur la survenue de cancers dans cette maladie et de pouvoir étudier les éventuels mécanismes impliqués.

Nos résultats montrent que dans deux modèles murins différents (D409V et D409/null) de MG, la croissance tumorale des cellules de mélanome est augmentée comparée aux contrôles, chez les femelles mais aussi chez les mâles. Nous avons étudié également au niveau cellulaire quels pouvaient être les types cellulaires impliqués. Nous montrons que les lymphocytes NKT ne sont pas diminués dans le foie et dans la rate; de plus, les lymphocytes T CD8+ et les cellules NK ne sont pas diminués dans les souris Gaucher par rapport aux contrôles.

En conclusion, nous décrivons le premier modèle murin de développement du mélanome dans la maladie de Gaucher. Dans ce modèle, les mécanismes à l'origine d'une croissance accrue du mélanome demeurent à préciser.

**ABSTRACT**

Sphingolipids represent a major class of lipids, and are important constituents of all eukaryotic cells. They comprise bioactive effectors implicated in key cellular functions, including cell differentiation, proliferation, motility, apoptosis or senescence. Moreover, their role in cancer is now well established for numerous sphingolipids.

Gaucher disease (GD) is an inherited lipidosis, with autosomal recessive transmission, due to the deficient activity of glucocerebrosidase (acid beta-glucosidase, encoded by the *GBA1* gene). This enzyme is one of multiple enzymes of the metabolic pathway of sphingolipids. It allows the degradation of glucosylceramide (GlcCer) to ceramide. GD is characterised by GlcCer storage of the reticulo-endothelial cells of the liver, spleen and bone marrow (Gaucher cells). Evidence has recently been provided for an overrepresentation of various cancers, in particular multiple myeloma, in GD. However, the underlying mechanisms remain speculative.

The goal of the present thesis work was to approach the bases for the occurrence of cancers in GD. We developed a model of cancerogenesis in GD, using murine models to study the possible role of microenvironment in cancer development in this disease and to investigate the possible cellular mechanisms implicated.

Our results showed that, in two different murine models (D409V et D409/null) of GD the tumor growth of melanoma cells is increased as compared to controls, both in males and females. We have also studied what cell types could be implicated. NKT lymphocytes are not decreased in the liver and spleen. In addition, the proportion of T CD8+ cells and NK cells is not reduced in GD mice as compared to controls.

In conclusion, we describe the first murine model of melanoma development in Gaucher disease. The underlying mechanisms for the facilitated growth of melanoma in this mouse model remain to be further investigated.

**LISTE DES ABREVIATIONS**

ADN(c) : acide désoxyribonucléique (complémentaire)
aSMase : sphingomyélinase acide
α–GalCer : α–galactosylcéramide
α-syn: α-synucléine
BSA : Bovine Serum Albumin
CBE : conduritol B epoxide
CD : Cluster of Differentiation
C1P: ceramide-1-phosphate
CERT : ceramide transfer protein
CDK: kinases cycline-dépendantes
DNJ : N-alkyl-déoxynojirimycine
ERT: enzymothérapie substitutive
ERAD: endoplasmic reticulum-associated protein degradation
FAPP2: four-phosphate adaptor protein 2
GalCer: galactosylcéramide
Gb3 : globotriaosylcéramide
GM3 : monosialoganglioside
GCase : glucosylcéramidase
GlcCer : glucosylcéramide
GlcSph : glucosylsphingosine
GCS : glucosylcéramide synthase
MG : maladie de Gaucher
LacCer : lactosylcéramide
LIMP2 : lysosomal integral membrane protein 2
LNL: loxP-Neo-loxP
MGUS : gammapathies de signification indéterminée
MPR : récepteurs au mannose-6-phosphate
PKC : protéine kinase C
POAS : α-oxamine synthase PLP-dépendante
PP2A/1: protéine phosphatase 2A/1
PPMP : 1-Phenyl-2-Palmitoylamino-3-Morpholino-1-Propanol
PS : phosphatidylsérine
RE : réticulum endoplasmique
S1P : sphingosine-1-phosphate
SCARB2 : scavenger receptor class B member 2
ShRNA: small hairpin ribonucleic acid
SRP: particule de reconnaissance du signal
RNA : ribonucleic acid
SK : sphingosine kinase
SM: sphingomyéline
SMase : sphingomyélinase
SMS : sphingomyéline synthase
SPT : sérine palmitoyl transférase
SRT: substrate reduction therapy
SVF : sérum de veau foetal
TCR : T-cell receptor
TGN : trans golgi network
TNF : tumor necrosis factor
TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand
UGCG: UDP-glucose ceramide glucosyltransferase
WB: western blot

# SOMMAIRE

**REVUE GENERALE** .....9
Introduction…….....10
1 Les sphingolipides : généralités…….....10
2 Le céramide……...10
3 Le Glucosylcéramide: le squelette de nombreux glycolipides……..……13
4. Les Glucosylcéramidases……..15
4.1. La glucosylcéramidase lysosomale…….....15
4.2. La β-glucosidase des acides biliaires…….....18
4.3. La protéine apparentée à Klotho……19
4.4 La lactase phlorizine hydrolase…….....20
5 La maladie de Gaucher……22
5.1 Histoire de la maladie de Gaucher……..23
5.2 Les signes cliniques……24
5.2.1 L'hépatosplénomégalie……..24
5.2.2 Les cytopénies……24
5.2.3 Les troubles de l'hémostase……...24
5.2.4 Les atteintes osseuses…….....25
5.2.5 Les signes cliniques de la maladie de Gaucher de type 2 et 3……...26
5.2.6 Le phénotype "bébé collodion"……..27
5.2.7 La maladie de Parkinson et la maladie de Gaucher……...27
5.3 Les modèles murins de la maladie de Gaucher……31
5.3.1 Le modèle chimiquement induit……31
5.3.2 La souris *Gba*-knockout ……31
5.3.3 Modèles avec mutations ponctuelles……..32
5.3.4 Les mutations ponctuelles N370S, V394L, D409H et D409V……32
5.3.5 Les modèles de souris Gaucher conditionnelles……33
5.3.6 Les modèles murins avec atteinte neurologique……34
5.3.7 Les modèles animaux non murins……34
5.4 Le traitement de la maladie de Gaucher……..35
5.5 La physiopathologie……37
5.5.1 Accumulation de substrat……...37
5.5.2 Repliement anormal de l'enzyme et stress du réticulum endoplasmique……..38
5.5.3 Mécanismes d'oxydoréduction……..38
5.5.4 Les troubles de l'homéostasie calcique……..39
5.5.5 Autophagie……40
5.5.6 Rôle du facteur de transcription EB (TFEB)……40
5.5.7 La voie du récepteur interagissant avec la protéine kinase-3……40
6.Glucosylcéramide et cancer……...41
6.1 Glucosylcéramide synthase et cancer……..41
6.2 Glucosylcéramidases et cancer……44
6.2.1 Glucosylcéramidase lysosomale et cancer……44
6.2.2 Glucosylcéramidase non lysosomale et cancer……..52
6.2.3 La protéine apparentée à Klotho et cancer……52

**TRAVAUX EXPERIMENTAUX**……..53
1 Objectif général de la thèse……54
2 MATÉRIELS ET MÉTHODES…..…….....54
2.1 Cellules
- Cellules de mélanome B16F10……....54

- Cellules de mélanome A375……54
2.2 Transfection ShRNA…….....54
2.3 Tests de viabilité cellulaire…..…….....55
2.4 Formation des sphéroïdes…… ……55
2.5 Animaux…….……..55
- Souris D409V/D409V…….....55
- D409V/Null (9V/null) ……...…...55
2.6 Génotypage…….…….…56
2.7 Analyse de la croissance tumorale murine…….……..56
2.8 Cytométrie en flux …….……57
2.9 Mesure de l'activité enzymatique…….……...57
2.10 Western blot…….…..……58
2.11 Analyse des lipides par chromatographie en couche mince…….……..58
2.12 Analyse des lipides par spectrométrie de Masse…….……...59
2.13 Analyses statistiques…….……59

3 RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX……..60
3.1 Développement d'un modèle cellulaire de maladie de Gaucher dans la cellule de mélanome……..60
3.2 Développement d'un modèle animal de cancérogénèse dans la maladie de Gaucher……61
3.2.1 Le modèle de souris Gaucher pour la cancérogénèse montre un déficit en GBA dans le foie et dans la rate……62
3.2.2 Le modèle de souris Gaucher pour la cancérogénèse montre une surcharge en glucosylcéramide dans le foie et dans la rate……64
3.2.3 La croissance tumorale des cellules de mélanome est augmentée chez les souris Gaucher femelles (409/409). ……....64
3.2.4 La croissance tumorale des cellules de mélanome est augmentée dans les souris Gaucher mâles (409/409). ……64
3.2.5 La croissance tumorale des cellules de mélanome est augmentée dans les souris Gaucher femelles (409/null)……..65
3.2.6 La croissance tumorale des cellules de mélanome est augmentée dans les souris Gaucher mâles (409/null). ……66
3.2.7 Les cellules iNKT du foie, de la rate et du thymus ne sont pas réduites dans le modèle de souris Gaucher (409/409). ……..67
3.2.8 Les cellules infiltrant la tumeur dans les souris Gaucher D409V/D409V ne sont pas augmentées. ……...69

**4 DISCUSSION**…….. ……70

**CONCLUSION**……...…….78

**RÉFÉRENCES**……81
ANNEXE I : Glucosylceramidases and malignancies in mammals. Biochimie 2016
ANNEXE II : Human genetic disorders of sphingolipid biosynthesis. J Inherit Metab Dis 2015
ANNEXE III : Monogenic neurological disorders of sphingolipid metabolism. Biochim Biophys Acta 2015
ANNEXE IV : Gaucher's disease to rescue Parkinson's disease: from bed to bench.(Soumis)

# REVUE GENERALE

# Introduction

## 1 Les sphingolipides : généralités

Les sphingolipides représentent une classe majeure des lipides qui sont des constituants de toutes les cellules eucaryotes, découverts en 1876 par J.K.W. Thudichum (1). Les sphingolipides se trouvent chez tous les animaux, les plantes, les champignons, et certains procaryotes et virus. Ils sont localisés principalement dans les membranes et notamment la membrane plasmique des cellules de mammifères, où ils jouent un rôle structurel important dans la régulation de la fluidité.

Les sphingolipides sont des molécules amphiphiles qui ont des propriétés à la fois hydrophobe et hydrophile. La région hydrophobe est constituée par une base sphingoïde à longue chaine (le plus souvent sphingosine, sphinganine ou phytosphingosine), à laquelle est lié un acide gras par une liaison amide (2). Le plus simple des sphingolipides est le céramide (N-acylsphingosine) avec une région hydrophile minimale comprenant deux groupes OH. Le céramide peut être phosphorylé en céramide-1-phosphate ou glycosylé par les glucosyl- ou galactosyl-céramide synthases pour former le glucosylcéramide (GlcCer) ou le galactosylcéramide. Le céramide peut aussi être lié à un groupement phosphocholine provenant des phosphatidylcholines pour la synthèse de sphingomyéline par les sphingomyéline synthases (3). Les sphingolipides complexes peuvent aussi conduire à la formation de GlcCer ou de galactosylcéramide grâce à l'action séquentielle de glycohydrolases spécifiques. En effet, la complexité structurale des sphingolipides est due à un réseau élaboré d'enzymes de biosynthèse et de dégradation. Des avancées majeures ces 25 dernières années dans la compréhension du métabolisme de sphingolipides ont montré que les sphingolipides ne sont pas seulement des molécules inertes mais aussi des effecteurs bioactifs impliqués dans des fonctions cellulaires clés comme la différenciation, la prolifération, la motilité, l'apoptose, l'autophagie et la sénescence (4).

## 2 Le céramide

Dans les cellules de mammifères, le céramide peut être synthétisé par diverses voies. Le céramide est composé d'une charpente de sphingosine, liée par une fonction amide à un acide gras de longueur variable de C14 à C26, plus ou moins insaturé ou hydroxylé (5, 6).

Le céramide sert de précurseur à de nombreux sphingolipides comme la sphingomyéline (SM) ou le GlcCer, le galactosylcéramide (GalCer) ainsi que les glycosphingolipides plus complexes et les gangliosides. Le céramide peut également être converti en céramide-1-

phosphate (C1P) par la céramide kinase. La biosynthèse de SM nécessite au préalable le transport du céramide du réticulum endoplasmique (RE) à l'appareil de Golgi par une protéine de transport dite CERT (7, 8). Dans le Golgi, le céramide peut être converti sur sa face cytosolique en GlcCer mais par un processus CERT-indépendant. Le céramide peut également être généré par le catabolisme des sphingolipides complexes, par diverses enzymes comme des sphingomyélinases et glucosylcéramidases. Le céramide peut ensuite être utilisé comme substrat des céramidases pour libérer acide gras et sphingosine, qui sera phosphorylée en sphingosine 1-phosphate (S1P).

Les premières réactions de la biosynthèse *de novo* de la base sphingoïde sont la formation de 3-cétosphinganine par la condensation de L-sérine et de palmitoyl-CoA suivie rapidement par la réduction en sphinganine (Fig. 1). La première réaction est catalysée par la sérine palmitoyl-transférase (SPT, palmitoyl-CoA:L-sérine C-palmitoyltransférase; EC 2.3.1.50), chez les mammifères SPTLC1, SPTLC2 et SPTLC3 (9, 10), enzyme dépendante du pyridoxal 5-phosphate. La SPT est une enzyme membre de la superfamille α-oxamine synthase PLP-dépendante (POAS) (11-13). Les études structurales montrent que le pyridoxal 5-phosphate se lie de manière covalente à un résidu lysine (Lys265) de l'enzyme (14). Chez la plupart des organismes la SPT comprend au moins deux polypeptides séparés, localisés dans la membrane du RE, le site actif étant orienté vers le cytosol (14, 15) ; la SPT pourrait également être présente dans le noyau (16, 17). D'autres protéines pourraient jouer un rôle régulateur de la SPT comme deux sous-unités ssSPTa et ssSPTb en influençant la sélection de l'acyl-CoA (18). De plus, la biosynthèse des bases sphingoïdes est négativement régulée par les protéines ORMDL (19). La SPT n'est pas strictement spécifique de la L-sérine mais est capable d'utiliser également la L-alanine et la glycine pour produire la 1-désoxysphinganine and 1-désoxyméthyl-sphinganine (20-22). Ces dérivés pourraient être responsables de la neurotoxicité à la base de la neuropathie sensitive héréditaire de type 1 en rapport avec certaines mutations de la sous-unité SPTLC1 de la SPT (20). Elle est capable d'utiliser des substrats métaboliquement liés, la sérine et la glycine pouvant être convertie l'une en l'autre par la sérine hydroxyméthyltransférase, la sérine pouvant être catabolisée en pyruvate, un précurseur de l'alanine, par la sérine deshydratase (23). La SPT est ainsi à l'intersection de plusieurs voies métaboliques majeures comme la glycolyse, le métabolisme des acides aminés et le métabolisme lipidique. La SPT est habituellement plus active sur le palmitoyl-CoA (C16:0) comme co-substrat mais elle peut également utiliser des acyl-CoA plus ou moins longs d'un carbone, qui sont moins abondants que le palmitoyl-CoA dans les cellules de

mammifères (11, 24). Ceci expliquerait la proportion importante de bases sphingoïdes à 18 carbones dans la plupart des sphingolipides des mammifères (25).

La base 3-céto-sphingoïde est réduite en sphinganine par une réductase NADPH-dépendante (26) puis N-acylée en différents dihydrocéramides par une famille de céramide synthases (CerS) (27, 28) ou phosphorylée en S1P par des sphingosines kinases (29, 30).
Le premier gène de CerS cloné fut CerS1 initialement appelé Lass1 ayant une forte sélectivité pour le stéaroyl-CoA donnant le C18-(DH)Cer. Ensuite, 5 autres CerS (CerS2 (C22 et C24); CerS3 (≥C24), CerS4 (C20±2), CerS5 (C16), et CerS6 (C14 et C16)) ont été caractérisées présentant des différences dans la sélectivité des substrats, le niveau d'expression et la distribution tissulaire. CerS1 a également un mode de régulation rapide avec un turn-over rapide, qui peut être plus rapide en cas de stress comme des UV ou des chimiothérapies. Ce turn-over résulte d'un processus d'ubiquitination et via le protéasome avec une translocation du RE à l'appareil de Golgi (31).

Le céramide est formé par réduction du dihydrocéramide. Il est particulièrement impliqué dans l'apoptose. Plusieurs stimuli, de nature variée, peuvent augmenter le taux intracellulaire de céramide, via une synthèse *de novo*, hydrolyse de SM par des sphingomyélinases ou la combinaison des deux voies. Parmi les agents qui peuvent élever le taux intracellulaire de céramide et induire l'apoptose, citons le choc thermique, les radiations ionisantes, les ultra-violets, le stress oxydant (LDL oxydées, NO), la progestérone, la vitamine D3, des agents chimiothérapeutiques (daunorubicine, cisplatine, rituximab, irinotecan, cytosine arabinoside, camptothécine, fludarabine, étoposide, gemcitabine, fenrétinide,), les cannabinoïdes, des cytokines et agents de stress (tumor necrosis factor (TNF-α), CD95, DR5/TRAIL, interleukine-1β (IL-1β), interféron-γ, et de nombreuses bactéries (5, 32, 33). Le céramide peut aussi réguler plusieurs voies gouvernant le cycle cellulaire via la déphosphorylation des produits du gène Rb ou l'inactivation de certaines kinases cycline-dépendantes (CDK) ou par l'up-régulation des inhibiteurs de CDK. Le céramide est aussi impliqué dans la sénescence par l'inhibition de la phospholipase D, la génération de diacylglycérol et l'activation de la protéine kinase C (PKC) (34). Tandis que la génération de céramide induite par les stimuli de stress peut provoquer la mort cellulaire, sa transformation métabolique peut affecter la réponse cellulaire. Par exemple, sa conversion en sphingomyéline par la SM synthase ou sa dégradation par des céramidases en sphingosine (secondairement convertie en S1P) peut

moduler le signal du céramide. La conversion du céramide en GlcCer pourrait également contribuer à moduler le signal du céramide.

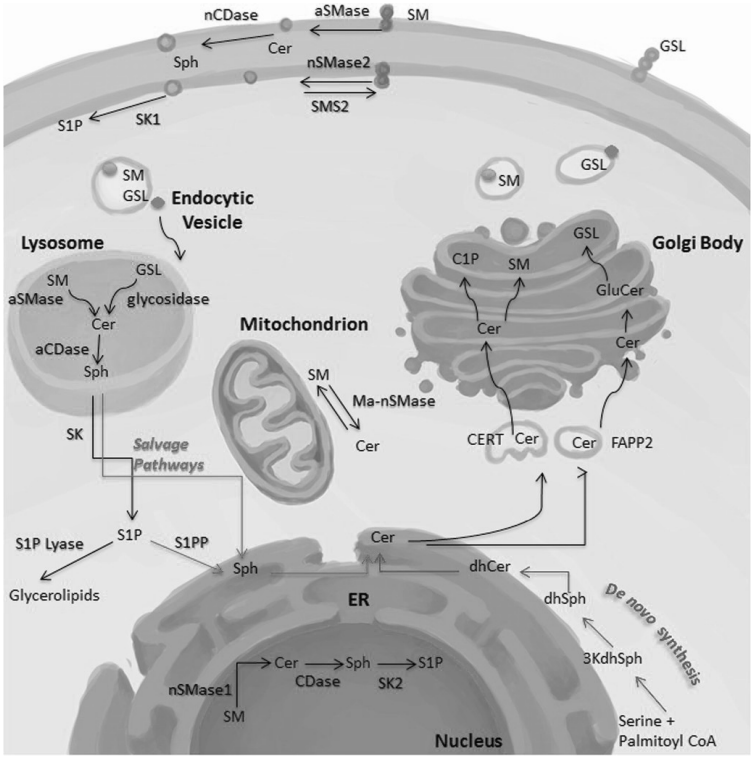


**Figure 1** (d'après (35))**: Les voies métaboliques des sphingolipides.** La synthèse *de novo* des sphingolipides a lieu dans le réticulum endoplasmique (ER) par une série de réactions de condensation et de réduction du céramide (Cer). Il peut être également formé dans les membranes associées aux mitochondries. Le Cer généré *de novo* est transporté par voie non vésiculaire par CERT et via un transport vésiculaire par FAPP2 au Golgi. Dans le Golgi, Cer est modifié pour former la sphingomyéline (SM), le céramide-1-phosphate (C1P) et le glucosylcéramide (GlcCer), ce dernier servant de précurseur pour les glycosphingolipides complexes (GSL). Après la synthèse dans le Golgi, SM et GSL complexes sont délivrés à la membrane plasmatique par une transport vésiculaire. De nombreuses enzymes du métabolisme des sphingolipides sont présentes à la membrane plasmatique pour réguler le niveau de SM, Cer, Sph et S1P. La S1P est produite par la sphingosine kinase 1 et 2. Durant l'endocytose, les sphingolipides membranaires sont internalisés et transportés au lysosome via des vésicules d'endocytose; l'hydrolyse est catabolisée par la sphingomyélinase acide (aSMase), la céramidase acide (aCDase), et la beta-glucosidase. La sphingosine (Sph) peut être phosphorylée par la SK pour former la S1P qui sera dégradée par la S1P lyase. Simultanément, la S1P peut être utilisée par la voie de sauvetage pour générer du Cer. Dans le noyau, la SM peut être ciblée par la sphingomyélinase neutre 1 (nSMase1), et ensuite, la Sph générée par cette voie peut être phosphorylée par la SK2. Abréviations : dhSph, dihydrosphingosine; 3KdhSph, 3-cétosphinganine; dhCer, dihydrocéramide; nSMase2, sphingomyélinase neutre 2; nCDase, céramidase neutre; SMS2, sphingomyélinase synthase 2; S1PP, S1P phosphatase; Ma-nSMase, sphingomyélinase neutre associée aux mitochondries.

## 3. Le Glucosylcéramide: le squelette de nombreux glycolipides.

Les glycosphingolipides sont des sphingolipides composés d'une charpente céramide et des résidus osidiques avec une très vaste hétérogénéité dans la partie hydrophobe (céramide) mais également dans la partie saccharidique. Une cellule de mammifère typique pourrait contenir plus de 10 000 espèces moléculaires de glycosphingolipides différents. En effet, plus de 60 bases sphingoïdes et plus de 300 chaînes oligosaccharidiques différentes sont caractérisées, créant ainsi une combinaison de milliers de structures différentes (36, 37). Les

glycosphingolipides sont divisés en deux grandes catégories: les glucosphingolipides et les galactosphingolipides (38). Le glucosylcéramide (GlcCer) occupe une position clé dans la biosynthèse de très nombreux glycosphingolipides (Fig. 2). En effet, 90% d'entre eux sont élaborés à partir du GlcCer (39). Le GlcCer peut être allongé par addition de carbohydrates résultant en une large variété de glycosphingolipides complexes tels que le lactosylcéramide (LacCer), le globotriaosylcéramide (Gb3), ou les gangliosides (par exemple, le monosialoganglioside (GM3). Par conséquent, le GlcCer représente le cœur structurel de plus de 300 glycosphingolipides structurellement différents incluant les gangliosides et les glycolipides neutres (40).

Le GlcCer est absolument essentiel dans le développement des mammifères. Les souris KO pour le gène (Ugcg) codant pour la GlcCer synthase, éliminant la voie principale de synthèse des glycosphingolipides conduit à une létalité embryonnaire au stade gastrulation et apparaît être en rapport avec une apoptose accrue dans l'ectoderme (41).

Le GlcCer est produit par la glucosylation du céramide. Tandis que le céramide est converti en SM par la sphingomyéline synthase 1 (SMS1) dans la partie luminale du Golgi (8, 42), le céramide est transporté du RE vers la face cytosolique du cis-Golgi par la voie alternative CERT-indépendante (43). Cette voie, non totalement élucidée, sert à la biosynthèse des glycosphingolipides (38). Le GlcCer est synthétisé à partir du céramide et de l'UDP-glucose par l'enzyme la glucosylcéramide synthase (GCS, EC 2.4.1.80, aussi connue comme une UDP-glucose:céramide glucosyltransférase ou GlcT-1) (Fig. 2) (44-46). La GCS, dont le gène humain UGCG est localisé dans la région chromosomique 9q31, est une protéine transmembranaire, composée de monomères de 38 kDa organisés en dimères ou oligomères (47). Elle est présente dans le cis-Golgi et a son site catalytique faisant face au cytosol, où le GlcCer nouvellement produit peut être reconnu par la protéine de transport FAPP2 (four-phosphate adaptor protein 2) (48). Dans un modèle sur le rôle de FAPP2 dans la synthèse des glycolipides, FAPP2 opèrerait un transfert net de GlcCer du cis-Golgi au réseau trans-Golgien (TGN), où par sa translocation dans la lumière, le GlcCer subirait une glycosylation en sphingolipides plus complexes (49). Dans un modèle alternatif, la majorité du GlcCer irait à la face cytoplasmique du RE par FAPP2 tandis qu'une autre fraction atteindrait le feuillet cytosolique de la membrane plasmique où il pourrait être transloqué. Dans le RE, après transport par FAPP2, le GlcCer serait envoyé vers la face luminale par des flippases et transporté à nouveau au Golgi par un trafic vésiculaire pour être converti en LacCer et GM3 dans le trans-Golgi (50).

Les glycosphingolipides complexes nouvellement synthétisés sont ensuite transportés vers le feuillet externe de la membrane plasmique par exocytose vésiculaire. Après endocytose ou phagocytose, ils atteignent les endosomes-lysosomes où ils sont principalement catabolisés, par enlèvement progressif de leur partie oligosaccharidique (51). La dégradation du GlcCer se fait dans le lysosome par une glucosylcéramidase, mais peut être aussi avoir lieu dans d'autres compartiments grâce à une glucosylcéramidase non lysosomale.

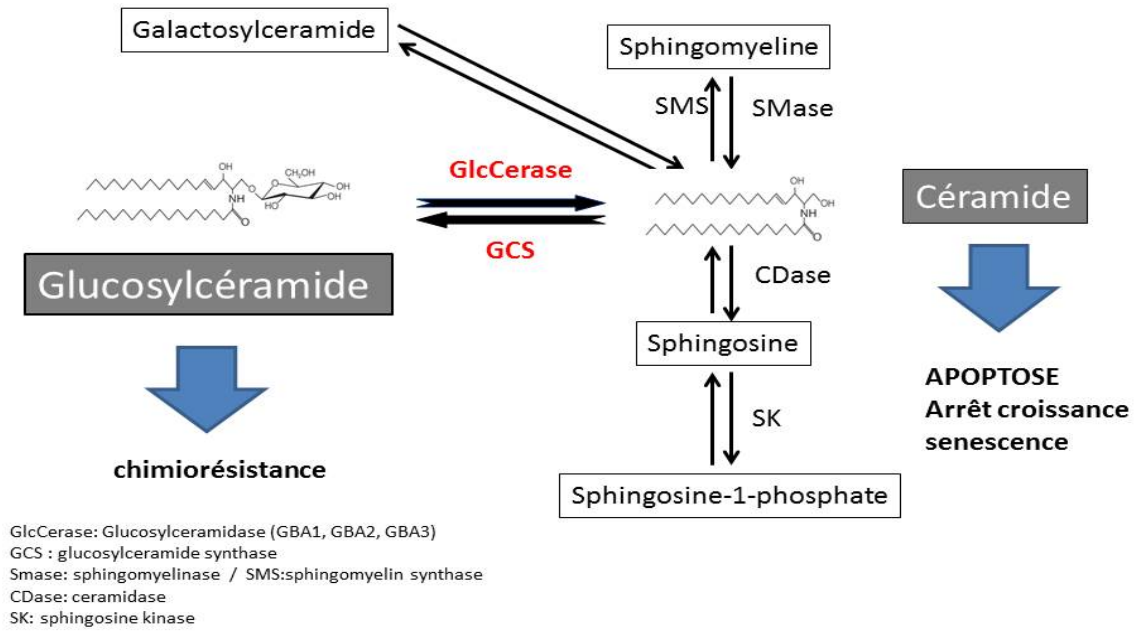


**Figure 2.** Métabolisme du glucosylcéramide et ses fonctions biologiques chez les mammifères.

## 4. Les Glucosylcéramidases

Le GlcCer est dégradé en glucose et céramide par trois hydrolases différentes : la GBA1 lysosomale et les GBA2 et GBA3 non lysosomales. Trois enzymes, trois gènes (voir Tableau 1).

### 4.1. La glucosylcéramidase lysosomale

La glucosylcéramidase ou β-glucosidase (GCase; D-glucosyl-N-acylsphingosine glucohydrolase; glucocérébrosidase; EC 3.2.1.45) est une protéine membranaire périphérique qui hydrolyse la liaison β-glucosidique de son substrat naturel GlcCer dans le lysosome mais aussi de substrats β-glucosidiques synthétiques (52). Elle requiert la présence de saposine C et de phospholipides chargés négativement (phosphatidylsérine par exemple) pour une activité

hydrolytique optimale sur le GlcCer (53). Elle appartient à la classe des glycoside hydrolases (54). De manière intéressante, elle peut aussi catalyser la formation du cholestéryl-β-glucoside (55). L'enzyme mature contient 497 acides aminés avec une glycosylation de 4 sur 5 sites de N-glycosylation. En effet, la glycosylation est nécessaire pour créer la conformation catalytiquement active et la première N-glycosylation est essentielle pour son activité (56). Son poids moléculaire varie entre 59 et 67 kDa (57). Le gène GBA1 est localisé en 1q21 et a été cloné et séquencé (58-60). Il comprend 11 exons et 10 introns s'étalant sur 7,6 kb (61).

L'analyse de la structure cristalline permet une meilleure compréhension de la GCase (62-64). Elle contient trois domaines: le domaine I (résidus 1–27 et 383–414) est composé de trois feuillets β-plissés anti-parallèles flanqués par un brin amino-terminal perpendiculaire et une boucle. Il contient deux ponts disulfures (résidus 4–16 et 18–23), qui peuvent être nécessaires pour un repliement correct. Le domaine II (résidus 30-75 et 431-497) composé de deux feuillets β-plissés associés fermement et formant un domaine indépendant, qui ressemble à un repliement de type immunoglobuline. Le domaine III (résidus 76–381 et 416–430) est un $(\beta/\alpha)_8$ TIM barrel qui contient le site catalytique, permettant de rattacher la GCase à la classe des glycoside hydroxylases A (GH-A) (65). Les domaines II et III semblent être connectés par une charnière flexible, tandis que le domaine I interagit étroitement avec le domaine III.

Des expériences de mutagenèse et de modélisation de la GCase suggèrent que le résidu E235 est le catalyseur acide/base et la spectrométrie en tandem a identifié le résidu E340 comme nucléophile (62, 66). La GCase pourrait procéder selon un mécanisme en deux étapes: une première (glucosylation) où le résidu nucléophile attaque la liaison anomérique O-glycosidique à C1, suivie par une deuxième étape avec don de proton du catalyseur acide/base à la liaison céramide-glucose. Le céramide est relargué et le complexe enzyme-glucose se forme. Les données sur la structure cristalline avec la N-alkyl-déoxynojirimycine (DNJ) suggère deux possibilités pour la première étape (67). Le mécanisme, le plus fréquemment admis, où l'attaque nucléophile sur le carbone anomérique est directe sans formation d'un ion carbonium intermédiaire, et un second mécanisme proposant que l'attaque nucléophile directe du carbone anomérique du glucose par E340 n'est pas possible car l'hydrogène apical sur le carbone anomérique est positionné entre l'atome de carbone et l'atome d'oxygène attaquant de telle façon que cela bloquerait l'attaque nucléophilique par encombrement stérique. L'hydrolyse de la liaison glycosidique doit par conséquent procéder par un ion carbonium intermédiaire (67). L'étape de déglucosylation inclut l'addition d'une molécule d'eau au complexe enzyme-glucosyl dans le processus de catalyse basique à l'aide d'un catalyseur acide/base pour libérer le β-glucose en régénérant l'acide de l'acide/base et le nucléophile.

Dans l'analyse de la structure cristalline, la cavité pour la molécule d'eau est située près du résidu catalytique E235; un emplacement équivalent est aussi retrouvé dans d'autres glycosidases.

La GCase peut être inhibée par des inhibiteurs irréversibles : le conduritol B epoxide (CBE, ou 1,2-anhydro-*myo*-inositol), mais aussi le cyclophellitol et le conduritol B aziridine (68, 69). Le CBE a été utilisé pour mieux comprendre la structure du site actif enzymatique mais aussi pour induire la maladie de Gaucher dans des macrophages, des cellules mésenchymateuses médullaires ainsi que chez des animaux (64, 70, 71). La GCase peut être inhibée également par d'autres inhibiteurs compétitifs tels que les alcaloïdes polyhydroxypipéridine ou iminosucres comme le DNJ, certains analogues N-alkylés de la DNJ, mais aussi la castanospermine, des analogues de l'isofagomine, des aminocyclitols (β-valienamine, β-validamine et dérivés N-alkylés de la β-valienamine) (72).

Comme les autres protéines lysosomales, la GCase est synthétisée dans les polyribosomes liés au RE, entre dans le RE par la particule de reconnaissance du signal (SRP), accompagnée par le clivage du peptide leader et la N-glycosylation de 4 aspargines (Asn-19, Asn-59, Asn-146 and Asn-270) (73). Une fois correctement repliée, l'enzyme est transportée au réseau Golgien puis transite vers le lysosome. Contrairement à la plupart des hydrolases lysosomales, la GCase n'est pas adressée au lysosome via les récepteurs au mannose-6 phosphate (MPR), présents dans le réseau trans-golgien (TGN) (74). Dans le RE, la GCase se lie à la protéine LIMP2 (lysosomal integral membrane protein 2) à un pH neutre et est transportée au TGN. LIMP-2 est codée par le gène SCARB2, aussi connu sous le nom de membre 2 scavenger récepteur de classe B. LIMP-2 forme une boucle transmembranaire N et C-terminale et contient un domaine luminal de 400 résidus fortement glycosylés. C'est un membre de la superfamille CD36 des récepteurs scavenger qui a été identifié comme récepteur pour l'Enterovirus 71 et le virus Coxsackie A16. Dans les compartiments prélysosomaux acides (endosomes tardifs), la GCase se dissocie de LIMP2 à un pH plus acide et s'associe aux membranes lysosomales (75, 76). De plus, un résidu histidine de LIMP-2 (H171) est identifié comme capteur critique de pH. Une étude récente semble montrer que LIMP-2 est modifié par l'addition post-traductionnelle de mannose-6 phosphate, et interagit en fait avec le MPR formant ainsi un complexe hétéro-trimérique MPR, LIMP-2 et GCase (77). Cependant, récemment, de nouvelles observations sur des lysosomes hépatiques et des fibroblastes embryonnaires murins ont été publiées, allant à l'encontre d'un trafic lysosomal MPR-dépendant de LIMP-2 et de la GCase (78).

Le déficit en LIMP-2 (gène SCARB2) n'est pas responsable du phénotype Gaucher mais d'une maladie autosomique récessive : le syndrome action myoclonus-insuffisance rénale (AMRF; OMIM#254900) (79). Elle associe une épilepsie myoclonique progressive avec surcharge (d'un matériel biologique non caractérisé) dans le cerveau et une glomérulosclérose focale avec une activité GCase faible dans les fibroblastes (80). LIMP-2 pourrait être un modificateur dans la maladie de Gaucher (MG) (81). Quand la GCase n'est pas correctement repliée, elle est retenue dans le RE et n'est pas efficacement transportée du RE au lysosome (82). Elle est rétrotransloquée vers le cytoplasme, subit une polyubiquitination et une dégradation protéosomale. Le degré de dégradation associée au RE (ERAD) serait corrélé à la sévérité de la MG (83).

### 4.2. La β-glucosidase des acides biliaires

La β-glucosidase des acides biliaires, aussi dénommée GBA2 (EC 3.2.1.45) est une β-glucosidase non-lysosomale. En effet, le fait qu'il n'y ait pas d'accumulation de GlcCer dans la plupart des cellules hormis les macrophages dans la MG, malgré un déficit sévère en GCase lysosomale, a suggéré une voie alterne du catabolisme de ce lipide. L'existence d'une β-glucosidase distincte ayant aussi une activité sur le GlcCer a pu être démontrée dans la MG (84). L'analyse de fractionnement subcellulaire révéla que cette enzyme n'était pas localisée dans le lysosome mais à la surface cytosolique du RE et du Golgi (85, 86). Dans le modèle où FAPP2 transporte le GlcCer vers le RE et où il est transloqué par une flippase vers le côté luminal du RE, GBA2 serait proche du site de synthèse du GlcCer et pourrait contrôler les quantités de GlcCer disponibles pour la synthèse des glycosphingolipides complexes. GBA2 fut initialement purifiée et caractérisée à partir de foie humain; des 3-O-glucosides biliaires synthétisés dans les microsomes de foie humain étaient les seuls substrats naturels supposés de GBA2. C'est la raison pour laquelle elle pris le nom de β-glucosidase des acides biliaires (87).

La masse moléculaire de la protéine est de 104,6 kDa avec 927 acides aminés (88). Il n'y a pas d'homologie significative avec les glycosyl hydrolases connues. Le gène GBA2 est porté par la région chromosomique 9p13.3. Le pH optimum de l'enzyme est entre 5.0 et 6.4. Cette enzyme est activée par des ions métalliques divalents et nécessite des phospholipides pour une activité optimale. Chez l'homme, GBA2 semble ubiquitaire et son ARNm est plus abondant dans le cerveau, le cœur, le muscle squelettique, le rein, le placenta, et à un niveau moins important dans le foie, la rate, l'intestin grêle, le poumon, et à très niveau très faible dans le

colon (mais pas la muqueuse), le thymus, et les leucocytes du sang périphérique (88). Chez la souris, l'expression de Gba2 est aussi ubiquitaire, avec un très haut niveau dans les testicules, le cerveau et le foie (89). Les souris déficientes en Gba2 accumulent du GlcCer et les mâles sont infertiles (89). En effet, l'analyse microscopique des spermatozoïdes révèle de grosses têtes (globozoospermie), un acrosome anormal et des défauts de mobilité (89). Le GlcCer s'accumule dans les testicules, le cerveau, le foie de ces souris knock-out (KO) mais sans symptômes neurologiques, organomégalie ou réduction de l'espérance de vie (89). La même souris déficiente en Gba2 montre un retard transitoire de régénération du foie après une hépatectomie partielle des deux tiers, à 1 et 3 jours mais pas à 5 et 7 jours après l'hépatectomie (90). Il est montré également une diminution des taux d'IL6, du TNF-α et une augmentation du TGF-β pendant la régénération hépatique. De plus, chez ces souris Gba2-KO, l'activation de STAT-3 est réduite simultanément à la décroissance des taux sériques d'IL-6 12h après l'hépatectomie partielle (90). L'étude de la voie médiée par le facteur de croissance de l'hépatocyte (HGF), évaluée par l'analyse de Met, le récepteur tyrosine kinase de haute affinité pour l'HGF, montre que Met est augmenté de manière prédominante chez les souris GBA2 KO pendant la régénération hépatique, suggérant que le GlcCer accélère la signalisation des facteurs de croissance (90).

GBA2 a initialement été décrite comme insensible au CBE; elle peut en fait être inhibée par le CBE de manière temps-dépendante (91). Elle peut aussi être inactivée par des iminosucres comme la N-butyl-déoxynojirimycine (*N*B-DNJ) ou la N-butyl-déoxygalactonojirimycine (*N*B-DGJ), cette dernière inhibant uniquement GBA2, ainsi que par certains dérivés hydrophobes d'adamantane (91-93).

Des mutations du gène GBA2 sont retrouvées chez des patients présentant une paraplégie spastique héréditaire (SPG46) avec atteinte pyramidale, troubles mentaux, cataracte, hypogonadisme chez les mâles, atrophie de degré variable du corps calleux et du cervelet, mais également dans certains cas une ataxie cérébelleuse avec spasticité autosomique récessive (94-96). La GBA2 est impliquée dans le développement du système nerveux central (SNC) comme le montre son invalidation chez le poisson zèbre, responsable d'un comportement moteur anormal et d'une croissance axonale altérée des motoneurones (94, 97).

### 4.3. La protéine apparentée à Klotho

La β-glucosidase cytosolique humaine (hCBG), aussi connue sous le nom de Klotho-related protein (KLrP ou GBA3, EC 3.2.1.21) est une enzyme appartenant à la famille des glycoside

hydroxylases (GH1) qui est capable d'hydrolyser une large variété de substrats osidiques, tels que le β-D-glucose, β-D-galactose, β-D-fucose, β-D-xylose ou l'α-L-arabinose, associés à un groupe hydrophobe (98, 99). L'hCBG est une protéine soluble et présente dans le rein, le foie, la rate, l'intestin et les lymphocytes des mammifères. Sa masse moléculaire est d'environ 53 kDa; son pH optimum est de 5-6. Le gène GBA3 est localisé dans le locus 4p15.31 et l'ADNc a été cloné (100). KLrP est capable de dégrader le C6-NBD-GlcCer en présence de CBE à un pH neutre mais aussi d'autres substrats artificiels comme le 4-MU-Glc, le C6-NBD-GalCer et le 4-MU-GalCer. KLrP pourrait être définie comme une "β-glycosylcéramidase" plus qu'une "β-glucosylcéramidase" (101). Le GlcCer naturel semble être un substrat de la GBA3, comme démontré par l'augmentation de la concentration de GlcCer dans des cellules dont l'expression de GBA3 a été éteinte par siRNA. Cependant, cette notion est contestée (102). Non seulement, le GlcCer intracellulaire reste inchangé après le traitement de cellules par un nouvel inhibiteur spécifique de GBA3, mais aussi une forme tronquée de GBA3 n'a pas d'impact sur la sévérité des patients avec MG.

L'étude de la structure aux rayons X de KLrP et la mutagénèse dirigée ont révélé que KLrP contient une partie dite (β/α)8 TIM barrel dans laquelle les résidus E165 et E 373, dans les feuillets β-plissés 4 et 7, pourraient servir de catalyseur acide/base et de nucléophile, respectivement (101).

Le déficit en protéine KL (Klotho) dans un modèle de souris est responsable d'un large spectre d'anomalies comme une espérance de vie raccourcie, une artériosclérose, une infertilité, une peau atrophique, un emphysème et une ostéopénie ressemblant à un processus de vieillissement prématuré (103).

Chez l'homme, l'hCBG agirait sur divers xénobiotiques, dont les dérivés sucrés de phyto-oestrogènes, flavonoïdes), simples phénoliques et cyanogènes, avec une affinité élevée et une spécificité pour les xénobiotiques alimentaires plus grande que pour les aryl-glycosides (104). Ces données indiquent que la hCBG hydrolyse une large variété de glucosides alimentaires et suggère un rôle dans le métabolisme des xénobiotiques.

### 4.4 La lactase phlorizine hydrolase

La lactase phlori(d)zine hydrolase (LPH; EC 3.2.1.108/62) est une β-glucosidase humaine présentant une large spécificité de substrat (105). L'enzyme est ancrée dans la muqueuse de la bordure en brosse de l'intestin grêle et clive le lactose, le cellobiose, les glycosyl-β-céramides et divers aryl-β-glycosides dont la phlorizine (106). Cependant, la capacité de la LPH à

hydrolyser *in vivo* le GlcCer d'origine alimentaire n'est pas documentée de manière convaincante (107).

La LPH porte deux sites catalytiques séparés. Le site phlorizine hydrolase comprend le résidu E1273 et le site lactase E1789 (108). Le site lactase est sélectif pour les glycosides avec des motifs hydrophiles tels que la phlorizine et les glycosylcéramides (106). La LPH peut aussi hydrolyser les glycosides (iso)flavonoïdes et la pyridoxine-5'-β-D-glucopyranoside, une forme alimentaire de la vitamine B6 (104, 109). Un déficit en LPH est responsable de l'intolérance au lactose qui est relativement fréquente sauf chez la majorité des Européens du nord et certaines tribus nomades africaines et arabes qui conservent une activité lactase et digèrent le lactose durant toute leur vie (104). L'hypolactasie de type adulte (MIM# 223100) est la conséquence d'une diminution de l'activité lactase pendant l'adolescence et à l'âge adulte, un processus physiologique.

Le déficit congénital en lactase (MIM# 223000) est une maladie héréditaire autosomique récessive, avec une pathologie gastro-intestinale sévère chez l'enfant. L'activité lactase de la muqueuse intestinale est diminuée et conduit à une diarrhée hydrique tout de suite après l'allaitement ou l'introduction de lait artificiel contenant du lactose. Les symptômes de diarrhée sévère osmotique et de perte de poids apparaissent dans les premiers jours de vie. Les enfants ont une croissance et un développement normal avec un régime sans lactose. Son incidence est de 1/60000 et est plus fréquente dans la population finlandaise mais est retrouvée ailleurs dans le monde.

Table 1. Les principales caractéristiques des glucosylcéramidases des mammifères

| **Enzyme** | | **Gène** | | **Protéine** | | | **Propriétés enzymatiques** | | **Maladie génétique humaine** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nom | Synonymes | Nom | Localisation chromosomique | Longueur (AA) | Tissus | Localisation intracellulaire | Substrats | pH optimal | |
| β-glucosylcéramidase acide | β-glucosidase acide; β-glucocérébrosidase acide | *GBA1* | 1q21 | 536 | Ubiquitaire | Membrane lysosomale | GlcCer; glucosylsphingosine | 4-5 | Maladie de Gaucher |
| β-glucosylcéramidase non lysosomale | β-glucosidase des acides biliaires; β-glucosylcéramidase 2 | *GBA2* | 9p13 | 927 | Cerveau, coeur, muscle squelettique, rein et placenta | RE, Golgi, membrane plasmique | acides biliaires conjugués; GlcCer | 5.5-6.5 | Ataxie cérébelleuse congénitale et paraplégie spastique |
| β-glucosidase cytosolique | protéine apparentée à Klotho | *GBA3* | 4p15 | 469 | Foie, intestine grêle, rate, rein | Cytosol | glycosides flavonoïdes ; C6-NBD-GlcCer | 6-7 | nd |

Abréviations: AA, acides aminés; RE, réticulum endoplasmique;
C6-NBD-GlcCer, 6-[N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl-glucosylsphingosine; non décrit.

**5 La maladie de Gaucher**

Le déficit en GBA1 est responsable de la maladie de Gaucher (MG), la maladie lysosomale la plus fréquente. C'est une maladie héréditaire de surcharge lipidique, avec une transmission autosomique récessive. La MG résulte de mutations pathogènes du gène GBA1 (110). Le phénotype MG peut exceptionnellement résulter d'une mutation du gène codant pour la prosaposine, PSAP (111, 112).

Il y a à ce jour environ 350 mutations décrites du gène GBA1. La majorité des mutations sont des mutations faux-sens (75%) mais des mutations non-sens (6,4%), mutations du site d'épissage (0,5%), petites insertions et délétions (13,5%), ainsi que des allèles complexes (0,5%) sont aussi décrits (82). Certaines mutations de GBA1 sont prévalentes. Ainsi, la mutation dite N370S (c.1226A>G, p.Asn409Ser) est très fréquente au sein de la population juive Ashkénaze et est associée exclusivement au type 1 (113). La mutation la plus fréquente dans la population non juive est la mutation dite L444P (c.1448T>C, p.Leu483Pro), prédisposant au développement de la forme neuropathique lorsqu'elle est à l'état homozygote (114). La mutation dite D409H (c.1342G>C, p.Asp448His) est associée, lorsqu'elle est homozygote, à un phénotype de maladie valvulaire cardiaque, apraxie oculomotrice mais sans atteinte viscérale (115). L'analyse du génotype de la MG peut donc permettre d'avoir des éléments sur la nature de la progression de la maladie et sur le pronostic familial (116). La MG est rare avec une fréquence d'1 sur 57000 naissances dans la population d'origine européenne tandis qu'elle est fréquente chez les juifs Ashkenazi où la fréquence est de 1 sur 800 naissances (116, 117).

La connaissance des structures de la GCase et des saposines permet une meilleure compréhension des bases moléculaires de la dysfonction enzymatique dans la MG. Certaines mutations se trouvent dans ou proche du site catalytique mais d'autres mutations sont localisées dans le site d'interaction de la GBA avec la saposine C (SapC), un peptide activateur de 84 AA, issu du clivage de la prosaposine et essentiel pour l'hydrolyse du GlcCer (118, 119). En effet, la SapC montre une interaction réversible et pH-dépendante de l'enzyme avec le GlcCer dans des vésicules contenant des phospholipides anioniques (120, 121). On ne sait pas encore comment le GlcCer est transféré de SapC à la GCase. Selon une hypothèse (modèle de "solubilisateur"), SapC extrait le lipide de la bicouche lipidique dans un complexe soluble et puis se dissocie de la membrane pour former un complexe avec la GCase. Une deuxième hypothèse (modèle "liftase") considère que SapC reste liée à la membrane et forme un complexe avec la GCase qui clive le groupement GlcCer exposé (122). Concernant les

mutations, plus de 90 mutations ne sont cependant pas localisées dans les interfaces SapC/GBA, GlcCer/GBA ou dans le site catalytique et restent encore à expliquer.

Au plan clinique, la MG est caractérisée par une accumulation de GlcCer dans les cellules du système réticulo-endothélial du foie, de la rate et de la moelle osseuse (appelées cellules de Gaucher). La MG peut être subdivisée en trois phénotypes différents. Le plus fréquent est la forme non-neuropathique de type 1 (MIM# 230800) avec un début dans l'adolescence ou chez l'adulte, caractérisée par une hépatosplénomégalie, une anémie, une thrombopénie, et une atteinte osseuse; elle représente 95% des cas. La forme la plus sévère est la forme infantile, neuropathique aiguë de type 2 (MIM# 230900) avec une atteinte viscérale sévère et neurologique apparaissant tôt dans l'enfance et conduisant au décès tôt dans l'adolescence. La troisième forme est le type 3 neuropathique subaigu (MIM# 231000) caractérisé par une atteinte du système nerveux central chez l'adulte.

**5.1 Histoire de la maladie de Gaucher**

La MG fut décrite en 1882 par Philippe Charles Ernest Gaucher, dans sa thèse de médecine « De l'épithélioma primitif de la rate » (123). Philippe Gaucher est né le 26 juillet 1854 à Champigny, dans la Nièvre, et décédé le 27 janvier 1918. Elève brillant, il commence ses études de médecine à Paris en 1872, est externe de 1874 à 1876 puis est nommé Interne provisoire, puis nommé à l'internat en 1878 jusqu'en 1881. Gaucher fut préparateur d'histologie de 1880 à 1885, puis chef de travaux de bactériologie anatomopathologique jusqu'en 1892. Parallèlement, il fut chef de clinique en dermatologie infantile de 1884 à 1891. Il est nommé médecin des Hôpitaux en 1892, avec une orientation principale en dermatosyphiligraphie, puis chef de service de l'hospice Debrousse où il passe sa thèse d'agrégation sur la pathogénie de néphrites. En 1892, il fut nommé chef de service et Professeur titulaire de dermatologie de 1892 à 1901. Il devient membre de l'Académie de Médecine en 1910. Dans sa thèse, il décrit une seule patiente de 32 ans (Victorine) qui a une très grosse rate découverte à l'âge de 7 ans, qu'on palpait jusque dans la fosse iliaque gauche. Elle présentait des hémorragies (épistaxis, gingivorragies) et une altération de l'état général et parfois des douleurs dans les membres inférieurs. Elle décède au bout de trois ans d'aggravation et Philippe Gaucher va décrire la rate et l'histologie de celle-ci après l'autopsie réalisée le 6 avril 1881 à 9h du matin. Dès 1901, outre-Atlantique les auteurs Brill, Mandelbaum et Libman décriront cette pathologie en utilisant le nom de maladie de Gaucher (123).

## 5.2 Les signes cliniques

### 5.2.1 L'hépatosplénomégalie

Les signes cliniques de la forme de type 1 de la MG sont principalement une hépatomégalie et une splénomégalie. Dans une série de 413 patients de la cohorte du registre ICGG (International Collaborative Gaucher Group) n'ayant pas été splénectomisés, le volume hépatique moyen est de 1,7 fois la normale (124). C'est 76% des patients, le volume est supérieur à 1,25 fois la normale, tandis qu'il est supérieur à 2,5 fois la normale chez 17% des patients (124). Le volume hépatique des patients non splénectomisés est inférieur à celui des patients splénectomisés, qui est en moyenne à 2,2 fois la normale (124). Concernant la splénomégalie, chez 432 patients n'ayant pas été splénectomisés, le volume moyen de la rate est de 15,2 fois la normale, 87% des patients ayant un volume de rate supérieur à 5 fois la normale (124). La splénomégalie est le plus souvent asymptomatique, dans 67% des 183 cas de la série de l'équipe de Zimran, mais elle peut être responsable de douleurs abdominales, d'une gène abdominale, de satiété précoce, de douleur en décubitus latéral ou encore de douleurs coliques (125). De plus, les symptômes ne sont pas corrélés à la splénomégalie et bien qu'il existe un corrélation entre la taille de la rate et les paramètres de l'hémogramme, elle n'a pas de valeur au plan clinique (125).

### 5.2.2 Les cytopénies

Les cytopénies sont représentées par l'anémie présente chez 69% des patients de la cohorte de 835 patients n'ayant pas été splénectomisés, avec 44% des patients ayant une anémie modérée entre 12 et 10 g/dl et 25% des patients ayant une anémie plus importante inférieure à 10 g/dl (124). La thrombopénie est présente chez 76% des patients non splénectomisés avec 26% des patients ayant une thrombopénie inférieure à 60000/mm$^3$ et 50% des patients ayant une thrombopénie entre 60000 et 120000/mm$^3$ (124). La thrombopénie peut être la conséquence de l'infiltration médullaire compromettant la mégacaryocytopoïèse ou en rapport avec un hypersplénisme ou encore en rapport avec une origine autoimmune. En effet, des thrombopénies autoimmunes sont également rapportées dans la MG (126, 127).

### 5.2.3 Les troubles de l'hémostase

Les patients présentent également une tendance aux saignements, par toujours en rapport avec la thrombopénie, sous la forme d'épistaxis, gingivorragies, ecchymoses faciles, menstruations

importantes. Cette tendance peut être influencée par un déficit en facteurs de la coagulation ou une dysfonction plaquettaire (128). En effet, un déficit acquis de certains facteurs de la coagulation ont été décrits dans la MG, dont l'origine suspectée est une coagulation vasculaire disséminée faible ou une séquestration des facteurs par des cellules chargées en substrat (129, 130). On peut retrouver des déficits en facteurs II, VII, V, VIII, X, XI, XII (129). Des complexes thrombine-antithrombine sont retrouvés dans 46% des cas, suggérant que les déficits de la coagulation sont dus en partie à une consommation plus qu'à un défaut de synthèse et pourraient en partie être corrigés par l'enzymothérapie substitutive (126). De plus, la fibrinolyse peut être augmentée (131). La fonction plaquettaire est également altérée, avec une plus faible adhésion plaquettaire dans la MG comparée à des contrôles ou des hétérozygotes (132). L'adhésion plaquettaire n'est pas modifiée par l'enzymothérapie substitutive mais améliorée par la splénectomie. Les saignements muqueux sont associés à une adhésion plaquettaire anormale (132). 22% des patients ont également une agrégation plaquettaire réduite, mais qui n'est pas associée aux saignements muqueux (132). Une maladie de Willebrand acquise au cours de la MG a également été rapportée chez 8 patients (133).

### 5.2.4 Les atteintes osseuses

Les atteintes osseuses sont également fréquentes. En effet, dans le registre de l'ICGG en 2010, 37% des patients présentent des douleurs osseuses avec des crises osseuses chez 7% des patients (124, 134). Sur le plan radiologique, des lésions sont visibles chez 82% des patients avec une déformation en « flacon d'Erlenmeyer » chez 59% des patients, une ostéopénie chez 49% des patients, une infiltration médullaire chez 81% des patients, un infarctus chez 24% des patients, une ostéonécrose avasculaire chez 16% des patients, des fractures chez 7% des patients, des lésions ostéolytiques chez 18% des patients (124, 134). La mobilité peut être altérée chez 32% des patients et 15% présentent des douleurs importantes (135). Les biomarqueurs PARC/CCL18 et chitotriosidase ont été retrouvés associés à l'ostéonécrose et en particulier à l'ostéonécrose apparaissant malgré l'enzymothérapie (135). Dans une autre étude, le seul facteur de risque pour l'ostéonécrose retrouvé chez les patients est l'anémie et pour les fractures, une diminution du Z-score < -1 (136). Chez 930 patients du registre ICGG, l'ostéopénie avec un Z-score inférieur à 1 est retrouvée chez 44% des enfants, 76% des adolescents, 54% des adultes jeunes (20 à 30 ans) et 52% des adultes plus âgés (30 à 50 ans) (137). Chez les enfants ayant une ostéodensitométrie avec un Z-score < -1 initialement, l'utilisation de l'imiglucérase pendant 9 à 10 ans montre une amélioration du Z-score moyen

de -1,38 (95% IC:-1.73 à -1.03) à -0.73 (95% IC: -1.25 à -0.21), chez les jeunes adultes de -1.95 (95% IC: -2.26 à -1.64) à -0.67 (95% IC: -1.09 à -0.26), et chez les adultes plus âgés de -1.82 (95% IC: -2.00 à -1.63) à -1.30 (95% IC: -1.57 à -1.04) (137). Un retard de croissance est retrouvé chez 37% des patients (134). De multiples études montrent le bénéfice sur la densité osseuse de l'utilisation de l'enzymothérapie par imiglucérase (138-142), mais également par velaglucérase (143). Certaines études montrent aussi le bénéfice de l'enzymothérapie sur les symptômes osseux (144). Les traitements par réduction de substrat sont également capables d'améliorer la densité osseuse. Les résultats combinés de 3 études internationales avec le miglustat montrent sur un groupe de 72 patients, une amélioration significative du Z-score à 6, 12 et 24 mois tant au niveau fémoral que lombaire (145). On notait une augmentation moyenne à 6 mois en lombaire de 0,15 et de 0,23 en fémoral; à 12 mois, respectivement de 0,19 et 0,21 et à 24 mois, respectivement de 0,21 et 0,18. Une augmentation significative était retrouvée en fémoral dans le sous-groupe des patients splénectomisés et en lombaire et en fémoral chez les patients ostéoporotiques (145). Un autre composé, l'eliglustat, agissant aussi par réduction de substrat, montre une amélioration de la densité osseuse sur 4 ans chez 19 patients, avec une augmentation de la densité minérale osseuse en T-score au niveau lombaire de 0,8% (146).

### 5.2.5 Les signes cliniques de la maladie de Gaucher de type 2 et 3

Les types 2 et 3 de la maladie de Gaucher sont les formes neurologiques avec atteinte du SNC. La distinction entre ces deux formes était initialement basée sur l'âge du début des signes neurologiques et sur la rapidité de progression de la maladie, mais la forme neurologique de la MG semble plus être un continuum phénotypique.

Dans la forme classique de type 2 de la MG, les symptômes apparaissent avant l'âge de 2 ans, sous la forme d'un développement psychomoteur rapidement limité entraînant le décès dans les deux premières années (147, 148). Ensuite, les signes initiaux les plus fréquents sont l'hyperextension du cou, des difficultés pour déglutir et un strabisme. Secondairement apparaissent en général des épisodes d'asphyxie, suivis d'apnées spontanées prolongées. Des crises convulsives généralisées, une épilepsie myoclonique et une microcéphalie peuvent être observées. Une atteinte pulmonaire est l'atteinte viscérale prédominante mais une hépatosplénomégalie, un retard de croissance, une thrombocytopénie ou une anémie sont présents.

La MG de type 3 comprend un groupe hétérogène avec des patients ayant des atteintes viscérales modérées à sévères combinées avec une atteinte neurologique lentement

progressive et variable. Certains sous-types ont été subdivisés en se basant sur la présence d'une épilepsie myoclonique progressive ou d'une apraxie oculomotrice associée à une atteinte systémique plus ou moins sévère (149). Les anomalies oculomotrices (paralysie supranucléaire horizontale) sont habituellement le premier signe neurologique. Des crises convulsives généralisées tonico-cloniques, une ataxie cérébelleuse, des signes extrapyramidaux, une régression cognitive ou des troubles psychiatriques peuvent être observés. Les patients portant un allèle L444P tendent à avoir une forme sévère, souvent neurologique, alors que les patients ayant un allèle N370S ne développent pas d'atteinte neurologique (53, 148, 150).

### 5.2.6 Le phénotype "bébé collodion"

Certains fœtus présentent à la naissance une atteinte cutanée généralisée, sous la forme d'un peau anormale, érythémateuse et fine, diffuse sur tout le corps mais prédominant parfois dans les régions plantaires et palmaires ou dans les plis. La MG est une étiologie de ces « collodion baby » (151). Ces atteintes dermatologiques sont en général absentes dans la MG de type 2. Cet aspect est observé dans 41% des cas de formes létales en périnatal de MG (152). Cette forme est caractérisée par une anasarque avec prématurité, détresse néonatale et décès dans les deux premiers jours, ou parfois une dysmorphie faciale, arthrogrypose, une hépatosplénomégalie variable conduisant au décès dans les trois mois.

### 5.2.7 La maladie de Parkinson et la maladie de Gaucher

Depuis les années 90, de multiples case reports puis des séries plus larges décrivent l'association clinique entre la maladie de Parkinson (MP) et la MG de type 1 (6). La MP est la deuxième cause de maladie neurodégénérative représentant 1% de la population de plus de 60 ans, conséquence d'une dégénérescence des neurones dopaminergiques du locus niger et de la déplétion en dopamine de leurs projections dans le striatum.

Les patients ayant une MG et une MP présentent un syndrome parkinsonien atypique par le fait qu'il débute à un âge plus jeune (41-55 ans) et qu'il existe une résistance au traitement conventionnel (153-156). Une augmentation de la prévalence de la MP est retrouvée chez les parents du 1er degré de patients Gaucher. A la suite de plusieurs études montrant une augmentation du risque de MP chez les homozygotes et les hétérozygotes ayant une MG, une étude internationale multicentrique a montré un odds ratio de 5,43 pour une mutation de la GBA1 chez les patients parkinsoniens, démontrant une association forte entre les mutations de la GBA1 et la MP (157). Cette étude a été confirmée par la suite dans de nombreuses ethnies

du monde entier (158). Actuellement, les mutations GBA1 représentent le risque génétique le plus important pour la MP.

De nombreuses études soulignent le rôle central de l'α-synucléine dans la pathogénie de la MP (159, 160). L'α-synucléine est une petite protéine de 14 kDa, dont la fonction n'est pas bien connue ; elle est présente dans le cerveau dans des fractions solubles et associées aux membranes, et particulièrement exprimée dans des terminaisons neuronales pré-synaptiques. Elle est dégradée principalement dans les lysosomes, en partie par autophagie (161, 162). Les corps de Lewy sont la caractéristique anatomopathologique de la MP et contiennent des inclusions éosinophiliques dans le cytoplasme neuronal, résultant d'une accumulation et d'un processing anormal d'α-synucléine (159, 163, 164). De telles inclusions ont été retrouvées dans le cerveau de patients Gaucher avec syndrome parkinsonien. Elles sont retrouvées dans toutes les synucléopathies comme la MP, la maladie à corps de Lewy et l'atrophie multisystématisée. Les mutations de l'α-synucléine (A30P, E46K, H50Q, G51D et A53T) et les duplications ou triplications de gènes sont aussi fortement associées à la MP (165).

C'est la forme soluble agrégée d'α-synucléine formant des fibrilles de type amyloïde et/ou la forme oligomérique intermédiaire qui serait responsable de la toxicité et enfin de la dégénérescence des neurones dopaminergiques (166). Elle peut se transmettre de neurone à neurone après être relarguée dans l'environnement extracellulaire par les exosomes puis endocytose (167). La voie de dégradation lysosomale peut nettoyer les agrégats d'α-synucléine préformée; le dysfonctionnement de cette voie pourrait résulter dans l'accumulation de ces agrégats dans les cellules neuronales et non-neuronales (168). Ces données révèlent un lien physiopathologique entre la GCase et le métabolisme de l'α-synucléine.

Des études récentes montrent que la réduction de l'activité GCase augmente le niveau de l'α-synucléine dans les cultures de neurones et dans des modèles de souris Gaucher. En effet, les lignées neuronales surexprimant des mutants de la GBA1 humaine (N370S, L444P, D409V, D409H, E235A et E340A) montrent une augmentation du niveau de l'α-synucléine, dépendant de la quantité de GCase mutante exprimée mais pas de l'activité enzymatique (169). De plus, le modèle de souris Gaucher D409V/D409V montre une augmentation âge-dépendante de l'α-synucléine dans les régions frontales à 12 mois (169). D'autre part, l'hérérozygotie pour la mutation L444P dans une souris transgénique de MP (mutation A53T α-synucléine) conduit à une activité GCase réduite, à une réduction de la dégradation de l'α-synucléine et à une exacerbation des déficits moteur et gastrointestinal (170). De plus, l'inhibition pharmacologique de l'activité GCase par le CBE augmente le niveau d'α-

synucléine dans une lignée de neuroblastome humain sans changement de l'ARNm de l'α-synucléine (171). Cependant, dans un autre modèle *in vitro*, une lignée neuronale différenciée et une autre lignée non-différenciée, le niveau de l'α-synucléine n'est pas altéré après traitement par le CBE (172). Les souris traitées par CBE montrent une augmentation de l'α-synucléine dans les neurones du locus niger et de l'astroglie ainsi qu'une transmission dopaminergique anormale (160).

L'inhibition de la GCase par le CBE est aussi capable d'induire des anomalies de la fonction mitochondriale et du stress oxydant dans des cellules humaines dopaminergiques (173).

En 2010, l'examen par microscopie électronique et confocale d'échantillons de cerveau a permis de retrouver la présence de GCase dans les corps de Lewy des patients ayant au moins une mutation de la GBA1 (174). La GCase est colocalisée avec l'α-synucléine mais aussi avec LAMP-1. En 2011, la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire montre qu'à pH acide, la GCase interagit directement avec la partie C terminale de l'α-synucléine (175). De manière surprenante, la mutation N370S de la GCase, de même que la forme de l'enzyme liée au CBE, montre une affinité réduite pour l'α-synucléine. L'α-synucléine fixée à la membrane interagit avec la GCase dans un complexe qui inhibe la fonction enzymatique (176). Les travaux de Mazzulli *et al.* ont permis de mieux comprendre les interactions entre l'α-synucléine et la GCase (177). Dans des cultures primaires de neurones, le silencing de la GCase par ShRNA est accompagné d'une réduction de 50% de l'activité de la GCase, d'une augmentation x 4 du GlcCer et une augmentation x 1,8 de l'α-synucléine. Le niveau inchangé d'ARNm d'α-synucléine suggère que l'augmentation de l'α-synucléine résulte d'une réduction de la capacité de dégradation lysosomale (177). De plus, des neurones dopaminergiques générés à partir de cellules souches totipotentes (iPS) dérivées de fibroblastes d'un patient Gaucher révèlent aussi une augmentation importante du niveau d'α-synucléine avec une réduction de la protéolyse des protéines de longue durée. Cette étude montre aussi que la neurotoxicité dépend des acides aminés 71-82 de l'α-synucléine, une région nécessaire pour sa polymérisation. Pendant ce temps, l'accumulation de la GlcCer affecte l'agrégation de l'α-synucléine *in vitro* en stabilisant les intermédiaires solubles oligomériques. Plus important, la déplétion en GCase peut faciliter la formation d'α-synucléine oligomérique soluble ou insoluble *in vivo*, dans des modèles de souris Gaucher (4L/PS-NA et D409H/D409H) et chez *Caenorhabditis elegans* (177). L'α-synucléine pouvant inhiber le transport vésiculaire entre le RE et le Golgi, l'étude montre que la surexpression d'α-synucléine inhibe le trafic intracellulaire de la GCase, conduisant à une diminution de l'activité lysosomale de celle-ci. Cela conduit Mazzulli *et al.* à proposer une boucle

pathogénique débutant dans le lysosome (Fig. 3) (177). Le GlcCer lysosomal accumulé augmenterait la formation et la stabilisation des oligomères solubles d'α-synucléine, éventuellement convertis en fibrilles amyloïdes. Cette accumulation produirait une dysfonction du trafic RE-Golgi de la GCase, conduisant à réduire la GCase dans le lysosome, favorisant l'amplification du GlcCer et la stabilisation des oligomères d'α-synucléine.

Cependant, l'absence d'α-synucléine oligomérique dans les échantillons de patient Gaucher de type 1 sans syndrome parkinsonien indique que d'autres facteurs doivent contribuer à l'oligomérisation de l'α-synucléine dans les MG neuropathiques. L'α-synucléine peut interagir dans un complexe avec GCase qui inhibe son activité de manière dose-dépendante (178).

L'analyse de cerveaux de patients parkinsoniens avec ou sans mutation GBA1 hétérozygote montre que la diminution de l'activité GCase est associée à une diminution de la protéine GCase mais sans modification de son ARNm ou du contenu lysosomal (178). La voie de dégradation UPR (unfolded protein response)/RE est active et pourrait jouer un rôle dans la réduction du niveau protéique de GCase. L'activité GCase est aussi diminuée dans le cerveau des patients ayant une MP sporadique sans mutation GBA1 (179).

Des modèles de souris de Gaucher montrant une accumulation d'agrégats d'α-synucléines semblent utiles comme modèles de traitement pour la MP en utilisant la GCase comme cible. La restauration de la GCase dans le cerveau de ces souris par thérapie génique améliore les lésions histologiques mais aussi le déficit de mémoire. La surexpression de la GCase dans le SNC de souris transgéniques, modèles de MP, améliore les lésions histologiques et l'accumulation d'agrégats d'α-synucléines (180).

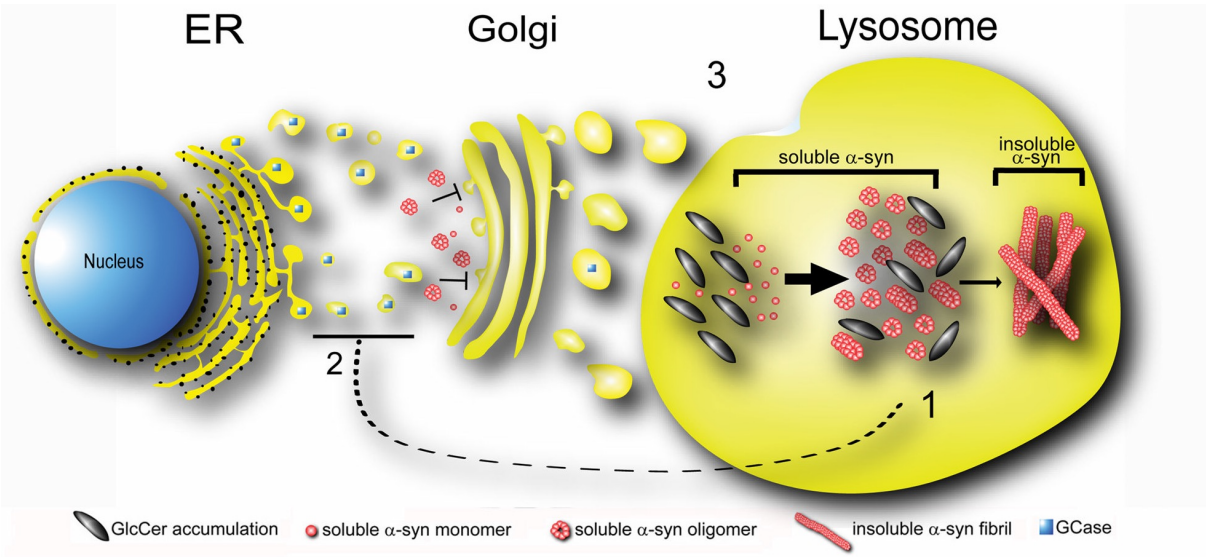


**Figure 3 : Boucle pathogénique de l'α-syn et de la déplétion en GCase dans le lysosome**. (d'après (177))
1) L'accumulation du GlcCer lysosomal accélère et stabilise les oligomères d'α-syn solubles (flèche épaisse), et finalement les convertit en fibrilles amyloïdes (flèche fine). 2) L'accumulation d' α-syn bloque le trafic dans le RE-Golgi de GCase 3) La diminution de la GCase dans le lysosome amplifie ensuite l'accumulation de GlcCer, la stabilisation d'oligomères solubles d'α-syn, résultant en une inhibition du trafic dans le RE-Golgi de la GCase, à chaque cycle pathogénique.

## 5.3 Les modèles murins de la maladie de Gaucher

Divers modèles murins de MG ont été développés pour la recherche (181).

### 5.3.1 Le modèle chimiquement induit

Ce modèle utilise l'injection intrapéritonéale quotidienne de CBE pendant 3 semaines inhibant plus de 90% de l'activité GCase et induisant l'accumulation de GlcCer dans la rate, le foie et le cerveau, réversible à l'arrêt du traitement (182). L'augmentation du taux de GlcCer peut être obtenue par l'injection de CBE combinée avec du GlcCer (183-185). Après 8 ou 9 injections quotidiennes intrapéritonéales de CBE (100 mg/kg/j), les souris présentent des symptômes neurologiques et meurent 7 à 12 jours après l'injection finale (186).

### 5.3.2 La souris *Gba*-knockout

Il s'agit du premier modèle génétique produit en 1992 par l'insertion d'une cassette Neo dans l'exon 9 et 10 du gène Gba, créant ainsi une souris portant une mutation nulle ayant moins de 4% d'activité résiduelle de la GCase et un phénotype sévère de type 2 (187). Le GlcCer s'accumule dans le foie, le cerveau, les poumons et dans les lysosomes des macrophages du foie et de la rate. La mortalité néonatale des souris *Gba* KO est élevée du fait de la perte d'eau importante en raison du défaut de perméabilité de la barrière cutanée (188, 189). Ce modèle pose cependant le problème d'une espérance de vie trop courte. Il a été utilisé pour étudier la

neuropathologie et montre dans le cerveau une down-régulation de Bcl2, du brain-derived neurotrophic factor (BDNF) et du nerve growth factor (NGF) (190, 191).

### 5.3.3 Modèles avec mutations ponctuelles

Par mutagenèse, ont été générées des souris avec la mutation « RecNciI » (L444P/A456P) responsable d'une MG de type 2 chez l'homme et des souris homozygotes pour la mutation L444P (L444P/L444P) (192). La souris RecNciI montre une activité résiduelle de l'enzyme inférieure à 4-9% d'activité de la GCase contre 20% pour la souris L444P/L444P. Les deux modèles meurent cependant tôt après leur naissance. La survie de ces souris a été augmentée en les croisant avec des souris KO pour la GCS, (en utilisant des souris $Gba^{+/L444P};Ugcg^{+/-}$, que l'on croise pour obtenir des souris $Gba^{L444P/L444P};Ugcg^{+/-}$, puis finalement des souris $Gba^{L444P/L444P};Ugcg^{+/+}$) avec une survie à de 50% à 1 an et une activité GCase à 15-20% (193). Les souris développent des signes de MG avec anémie, inflammation systémique, anomalies de la peau et diminution du cholestérol, mais sans accumulation de GlcCer ou cellules de Gaucher (193). Ce modèle a cependant été utilisé pour étudier l'efficacité de molécules chaperonnes, qui montrent une augmentation de l'activité de la GCase dans de nombreux tissus (194).

### 5.3.4 Modèles avec les mutations ponctuelles N370S, V394L, D409H et D409V

Les souris présentant les substitutions homozygotes D409H, D409V ou V394L ont des activités résiduelles de GCase diminuées à 4-10% mais ne présentent des signes de surcharge que progressivement sur plusieurs mois avec des accumulations faibles de GlcCer et quelques cellules de surcharge détectées dans la rate mais sans hépatosplénomégalie (195). Tandis que l'inhibiteur calcique Diltiazem augmente l'activité de la GCase dans les fibroblastes de ces souris, il n'a pas d'effet *in vivo* chez ces mêmes souris (196).

Les souris N370S/N370S ne meurent pas dans les 24h après la naissance du fait d'un défaut cutané, témoignant d'une différence notable quant à la dégradation du GlcCer dans la peau entre la souris et l'Homme (195).

Le croissement d'une souris portant une mutation ponctuelle avec un animal porteur de la mutation nulle entraîne un phénotype plus marqué d'accumulation de GlcCer et de cellules de surcharge, plus rapidement et sans développement d'atteinte neurologique (195). Ainsi, la souris D409V/null montre environ 5% d'activité de la GCase avec la présence de cellules Gaucher dans le foie, la rate, les poumons et la moelle osseuse à 4 mois et une accumulation

de GlcCer d'un facteur 4 à 16 selon l'âge (195, 197). Ce dernier modèle a été utilisé pour tester la thérapie génique en utilisant l'ADNc de GBA1 par vecteur adénoviral, révélant la prévention dans le développement de la maladie et une correction de l'accumulation du GlcCer dans les organes (197). Ce modèle a aussi été employé pour tester la réduction de substrat ou encore la combinaison avec la thérapie enzymatique substitutive (198, 199).

### 5.3.5 Modèles conditionnels

L'utilisation du systèmes *Mx1*-Cre-*loxP* a permis la création d'une délétion du gène Gba sous la dépendance de Cre par un traitement par polyI-polyC après la naissance (qui active le promoteur Mx1) (200). La délétion a ainsi lieu principalement dans les cellules hématopoïétiques et les cellules progénitrices. Les taux de GlcCer augmentent de 100 fois avec des aspects de cellules de Gaucher dans la moelle, le foie et la rate, avec une splénomégalie (x10), mais pas dans le cerveau. L'espérance de vie de ces souris est normale mais il n'y a pas de maladie osseuse ou du système nerveux. Grâce à cette souris, il a été montré que la transplantation de moelle et la thérapie génique peuvent éliminer les cellules Gaucher et qu'une augmentation modérée de l'activité de la GCase suffit à corriger la pathologie (200, 201).

Un deuxième modèle conditionnel de souris MG a été créé en délétant le gène Gba uniquement dans les cellules hématopoïétiques et endothéliales, conduisant à une activité enzymatique résiduelle de 7 à 18% dans le foie, la rate, le cerveau, la moelle osseuse, les leucocytes, et s'accompagnant d'une splénomégalie et d'une accumulation de GlcCer (202).

Le troisième modèle utilisant le système *Mx1*-Cre-*loxP* montre une réduction supérieure à 95% de l'activité de la GCase dans les cellules hématopoïétiques et les cellules souches mésenchymateuses avec une augmentation importante des taux de GlcCer et de glucosylsphingosine (GlcSph) dans la rate et le foie (203). Ces souris présentent une anémie, une splénomégalie mais également une atteinte osseuse avec des ostéonécroses et une ostéopénie, atteinte osseuse mimant celle observée dans la MG type 1. Ce modèle montre que l'ostéopénie provient plus d'un défaut des ostéoblastes qu'une augmentation de la résorption osseuse. La GlcSph et le GlcCer, la prolifération et la différentiation précoce des ostéoblastes médiées par la PKC contribueraient probablement au défaut de formation osseuse. De plus, ce modèle montre des anomalies diffuses du développement des cellules thymiques et dendritiques (203).

### 5.3.6 Modèles avec atteinte neurologique

Un modèle de MG neurologique aiguë a été généré par croisement d'une souris *gbalnl/lnl* caractérisée par l'insertion d'une cassette *loxP-Neo-loxP* (lnl) dans l'intron 8 de Gba, avec une souris transgénique kératine-14-Cre. Dans la souris ainsi produite, K14-lnl/lnl, l'expression de la Cre recombinase sous la dépendance du promoteur K14 permet l'excision de la cassette lnl et la restauration de GCase dans la peau (204). En effet, sans la restauration de la GCase dans la peau, la souris présente un déficit enzymatique dans la peau qui va conduire au décès quelques heures après la naissance, en rapport avec une perte d'eau excessive par la peau comme dans le premier modèle murin totalement déficient en GCase, créé par insertion d'un gène de résistance à la néomycine introduit dans l'exon 9 et 10. La souris K14-lnl/lnl a une activité réduite de la GCase dans le cerveau, la rate, le foie, une augmentation du GlcCer et des cellules Gaucher. Elle développe de plus une atteinte neurologique avec épilepsie et paralysie, associée à une perte neuronale et activation et prolifération de la microglie. Certaines de ces anomalies ressemblent à celles observées chez les patients ayant une MG neurologique (204). L'injection intraventriculaire cérébrale de GCase recombinante réduit les taux de GlcCer et de GlcSph, améliore la dégénérescence neuronale et l'astrogliose, et augmente l'espérance de vie des souris (205).

Un autre modèle est généré en restreignant le déficit en GCase au cerveau avec une augmentation du GlcCer dans le cerveau mais des niveaux normaux dans le foie et la rate. (204). Dans ce modèle nestin-flox/flox, l'expression de la Cre recombinase, placée sous contrôle du promoteur nestine, est limitée aux cellules neuronales et gliales mais absente des cellules de la microglie. La souris développe les mêmes symptômes et une atteinte neuropathologique semblable à celle de la souris K14-lnl/lnl mais avec un retard des symptômes neurologiques (16 jours contre 7).

Un autre modèle est généré par l'insertion de la cassette Néo dans l'allèle Gba portant la mutation D409H, croisée avec la souris K14-Cre, conduisant à la souris Kn-9H, ayant le même phénotype que la souris K14-lnl/lnl, atteinte neurologique devenant complète après 10 jours de CBE (186, 204).

### 5.3.7 Les modèles animaux de MG non murins

Une MG a été observée chez le chien ayant une activité GCase diminuée, une accumulation de GlcCer, des cellules Gaucher et une maladie neurologique progressive (206, 207).

Il a également été découvert une MG neurologique chez un mouton, avec des nouveau-nés présentant une maladie neurologique sévère, avec principalement des tremblements, une

incapacité à se tenir debout, une peau épaissie et qui ne vivent que quelques jours (208). Chez ces animaux, l'activité GCase est diminuée et le GlcCer s'accumule dans le cerveau (x100) et dans le foie (x15). Une surcharge lysosomale est observée dans les macrophages spléniques, les ganglions, le thymus et le système nerveux périphérique et central (208).

### 5.4 Le traitement de la maladie de Gaucher

Actuellement, le traitement de la MG est essentiellement basé sur l'enzymothérapie substitutive (ERT), développée depuis 1974 mais conceptualisée depuis la découverte du déficit enzymatique en 1966 (209). Initialement, divers essais ont été menés avec de la GCase purifiée de placenta humain, de la GCase injectée dans des globules rouges recouverts d'anticorps pour être captés par les macrophages, et également en tentant de faire rentrer la GCase dans des liposomes pour traiter quelques patients (210). La découverte des récepteurs mannose des macrophages en 1978 permet d'imaginer la création de modifications des chaînes oligosaccharidiques portant un résidu terminal mannose (211, 212). C'est en 1991 que la GCase avec des résidus mannose est produite (alglucérase) jusqu'au développement d'une GCase humaine recombinante (imiglucérase) en 1994 (213-216). Maintenant, de nouvelles enzymes substitutives comme la velaglucérase alfa (produite par de fibroblastes humains) et la taliglucérase alfa (dérivée de cellules de carotte) sont disponibles comme ERT (217, 218).

L'enzymothérapie substitutive améliore les cytopénies (anémie et thrombopénie), le volume de la rate dans les 6 mois et jusqu'à deux ans de traitement, la taille du foie en 2 à 5 ans, ainsi que les événements osseux (219). En effet, l'étude sur l'utilisation de l'imiglucérase pendant 10 ans montre une diminution de la splénomégalie de 19,4 fois la normale à 5,2 fois la normale (220). Le nombre de patients ayant une splénomégalie modérée ou sévère sont significativement moins nombreux après 10 ans de traitement par imiglucérase (220). L'hépatomégalie chez les patients non splénectomisés passe de 1,8 fois la normale à 1 fois la normale, avec disparition des patients ayant une hépatomégalie sévère. Les cytopénies s'améliorent également puisque l'hémoglobine chez les patients non splénectomisés passe de 11,2 à 13,6 g/dl, avec 88% des patients initialement anémiques qui ne le sont plus après 10 ans de traitement par imiglucérase. La numération des plaquettes s'améliore également de 95300/mm$^3$ à 166000/mm$^3$. De même, chez les patients splénectomisés, l'hémoglobine passe de 11,9 à 13,4, les plaquettes passent de 237200 à 311200/mm$^3$ (220). Chez les sujets splénectomisés, la taille du foie diminue également sous imiglucérase, passant d'une moyenne de 2,2 fois la normale à 1 fois la normale. Les douleurs osseuses passent également dans cette population de 88,9% à 61,1 % (220). Concernant les effets de l'imiglucérase sur l'os, chez les

patients non splénectomisées, parmi les 52,4% des patients présentant des douleurs osseuses, 57,1% n'ont plus de douleurs après 10 ans de traitement (220). Chez les patients n'ayant pas de douleurs osseuses avant l'initiation de l'imiglucérase, 84,3 % ont continué à ne pas ressentir de douleur après 10 ans de traitement. Chez les patients non splénectomisés, parmi ceux qui avaient des crises osseuses (16%) avant l'initiation de l'ERT, 92,6% n'ont plus de crises après 10 ans de traitement (220). De plus, aucun des patients ne présentant pas de crises osseuses n'en présentait après 10 ans d'imiglucérase. La vélaglucérase alfa montre des résultats similaires avec, à 12 mois, une augmentation de l'hémoglobine de 2,43 g/dl, des plaquettes de 50900/mm$^3$ et une diminution de la rate de 14,0 à 5,8 fois la normale (217). Les résultats de la vélaglucérase n'étaient pas inferieurs à ceux de l'imiglucérase dans un étude comparative (221). Le traitement par taliglucérase alfa après 9 mois de traitement permet lui une augmentation de 2,2 g/dl d'hémoglobine, d'environ 40000 plaquettes/mm$^3$ et une diminution de 38% de la taille de la rate et 11,1% de la taille du foie (218).

Le traitement par réduction de substrat (SRT) a été suggéré par la découverte du fait que certains iminosucres peuvent sélectivement inhiber (ou ralentir) la synthèse de certains glycosphingolipides. Le miglustat fut initialement développé comme inhibiteur de glucosidase avec une activité anti-virale potentielle mais s'est aussi révélé capable d'inhiber de manière réversible la GlcCer synthase (222). Le miglustat permet une diminution du volume de la rate de 19% et du foie de 12% après 12 mois de traitement et de 30% et 18% à 36 mois (223, 224). L'hémoglobine augmente de 1,3 g/dl et les plaquettes de 22000/mm$^3$ après 36 mois de traitement (224). Cependant, chez les patients passant de l'ERT vers le miglustat, on observe une diminution de l'hémoglobine de 0,95 g/dl et des plaquettes de 44100/mm$^3$ (225, 226).
L'éliglustat, un autre type d'inhibiteur de la GCS, montre sur une étude de quatre ans une augmentation du taux d'hémoglobine de 2,3 ± 1,5 g/dl (initialement: 11,3 ± 1,5 g/dl) et des plaquettes de 95% (initialement: 68700 ± 21200/mm$^3$) (146, 227, 228). Les volumes de la rate et du foie diminuent respectivement de 63% (initialement: 17,3 ± 9,5 fois la normale) et 28% (initialement: 1,7 ± 0,4 fois la normale). La chitotriosidase et le CCL-18 diminuent de 82%. L'atteinte osseuse s'améliore également avec une densité osseuse qui diminue au niveau lombaire de 0,8 (60%) (initialement: -1,6 ± 1,1). Les effets indésirables sont modérés. Par rapport à l'imiglucérase, l'éliglustat a montré récemment une non-infériorité sur le maintien des paramètres hématologiques et sur le volume des organes, chez des patients traités par ERT depuis au moins 3 ans, et randomisés pour 2/3 sous éliglustat et 1/3 sous imiglucérase (229).

## 5.5 Physiopathologie

**5.5.1 Accumulation de substrat** Le GlcCer fut découvert comme le lipide principal s'accumulant dans la MG en 1934 (Aghion 1934) et stocké dans tous les tissus (230). Le GlcCer s'accumule dans le foie et dans la rate au même degré dans les trois types de MG, aux environs de 30 à 40 mmol/kg dans la rate et, chez les patients de type 3 splénectomisés, de 24,1 ± 6,1 mmol/kg contre 9,9 ± 3 mmol/kg chez les non splénectomisés (231). La glucosylsphingosine (GlcSph), la forme déacylée du GlcCer, qui est presque inexistante normalement dans les tissus, est retrouvée à un niveau significatif dans le foie et la rate surtout dans les types 2 et 3, plus faiblement dans le type 1 (231). La concentration en GlcSph est anormalement élevée dans le cerveau des patients ayant une MG de type 2 ou 3, suggérant un rôle potentiel pathogénique dans ces formes (232). La composition des acides gras du GlcCer diffère entre le GlcCer cérébral et du GlcCer des autres tissus, l'acide stéarique (C18:0) prédominant dans celui du système nerveux (cerveau et cervelet) tandis que les acides palmitique (C16:0) et docosanoïque (C22:0) sont les plus abondants dans les tissus périphériques (233). Le GlcCer est élevé également dans le plasma des patients de types 1 et 3 (234, 235). De même, la concentration plasmatique de GlcSph est augmentée (236). Ce lysosphingolipide serait formé à partir du GlcCer accumulé sous l'action de la céramidase acide (237).

Malgré l'augmentation du GlcCer dans les tissues de la MG, cette élévation n'est pas suffisamment importante pour expliquer une augmentation de volume des organes. En effet, l'augmentation du volume hépatique (parfois jusqu'à 5 fois) et splénique (parfois jusqu'à 100 fois la normale) ne peut s'expliquer seulement par la surcharge en GlcCer qui représente moins de 2% de la masse de ces organes (238).

Le processus pathologique de la MG prend naissance dans le lysosome. Les macromolécules endogènes et exogènes, incluant les glycosphingolipides (et donc du GlcCer) sont délivrés au lysosome par divers processus tels que l'endocytose récepteur-médiée, la pinocytose, la phagocytose, et l'autophagocytose. La majorité des protéines lysosomales elles-mêmes sont envoyées au lysosome via le récepteur mannose-6-phosphate tandis que la GCase est adressée via la protéine LIMP2 (239). Le métabolisme phospholipidique est modifié dans des modèles neuronaux de MG (240) et dans des modèles chimiquement induits de macrophages (241). L'homéostasie du calcium est également perturbée dans des modèles neuronaux de MG ainsi que dans le cerveau de patients ayant une MG de type 2 (242-245).

Le GlcCer accumulé va produire de nombreuses réponses cellulaires en particulier dans les cellules de Gaucher, macrophages qui phagocytent des érythrocytes sénescents de la circulation (246-248).
Les cellules de Gaucher sont des cellules dérivées de macrophages, engorgées de lipides, de 20 à 100 nm de diamètre, ayant un petit noyau habituellement excentré et un cytoplasme caractéristique d'aspect feuilleté (249). Elles présentent à leur surface des marqueurs de macrophages, d'activité phagocytaire (246, 250, 251). L'accumulation de GlcCer dans ce macrophage conduit à des modifications fonctionnelles et phénotypiques (251). Ces cellules seraient à considérer plutôt comme des macrophages "alternativement activés" (200).
Les concentrations circulantes des cytokines suivantes sont élevées dans la MG : interleukine-1β (IL-1β), interleukine-1 receptor antagonist, IL-6, tumor necrosis factor-α (TNF-α), et IL-2 receptor soluble (sIL-2R), CD14 and M-CSF (252, 253). Ces facteurs pourraient jouer un rôle dans l'ostéopénie (IL-1β, TNF-α, IL-6 et IL-10), l'activation de la coagulation (IL-1β, TNF-α et IL-6), les gammapathies (IL-6 and IL-10) et le myélome multiple.

Il a aussi été proposé que la surcharge en GlcCer altère l'hématopoïèse en inhibant la prolifération et la différenciation des progéniteurs médullaires (254). Un article très récent montre que c'est en fait la GlcSph qui agirait comme molécule coupable, en jouant un rôle essentiel dans la survenue des hémopathies malignes (255).

### 5.5.2 Repliement anormal de l'enzyme et stress du réticulum endoplasmique.

Des anomalies de l'enzyme mutée elle-même pourraient jouer un rôle dans la pathogénie de la MG. Les mutations faux sens conduisent à un repliement anormal dans le réticulum endoplasmique (RE), à la source d'un stress du RE, puis à une dégradation prématurée par le protéasome.
Le degré de rétention dans le RE et de dégradation enzymatique serait corrélé à la sévérité de la maladie (83). L'activation de l'"unfolded protein response" (UPR) et une réponse anti-oxydante anormale sont retrouvées dans des fibroblastes de MG mais pas dans les cellules stromales mésenchymateuses médullaires ou dans les neurones; ces mécanismes ne seraient ainsi peut-être pas directement impliqués dans les processus neurodégénératifs au cours de la MG de type 2 ou 3.

### 5.5.3 Mécanismes d'oxydoréduction

La dysfonction de ces mécanismes pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie de la MG. En effet, des marqueurs systémiques de stress oxydant comme la catalase sont augmentés dans le sang des patients Gaucher (256). Les monocytes/macrophages de la MG sont activés et montre une diminution de la génération d'ion superoxyde, en rapport avec la surcharge en GlcCer, puisque ces dernières anomalies peuvent être reproduites par un surcharge en GlcCer sur des monocytes normaux (257, 258). Dans des cultures de fibroblastes primaires de patients Gaucher, le niveau d'espèces réactives oxygénées (ROS) et le contenu en protéines carbonylées sont significativement augmentés par rapport à des fibroblastes contrôles, suggérant que les cellules de le MG ont développé une réponse adaptative pour survivre à un état de stress oxydant chronique (259). Les cellules Gaucher sont aussi plus sensibles à l'apoptose induite par le peroxyde d'hydrogène, suggérant une dérégulation dans la réponse adaptative au stress oxydant dans lequel APE1/Ref-1 joue un rôle central (259).
En effet, la quantité de protéine APE1/Ref-1 dans le cytoplasme est significativement augmentée dans les fibroblastes de MG par rapport aux contrôles, et ces cellules ne sont pas capables d'augmenter l'expression de cette protéine après utilisation d' $H_2O_2$ (259). Les augmentations de ROS et APE1/Ref-1 sont dues à l'accumulation de GlcCer, puisqu'elles sont bloquées par le traitement des fibroblastes Gaucher par l'imiglucérase et reproduites par le traitement au CBE (259). L'augmentation de ROS serait liée à l'activation de la NAD(P)H oxydase. On notera cependant l'absence d'augmentation de la protéine APE1 dans les cellules stromales mésenchymateuses médullaires (70).

### 5.5.4 Les troubles de l'homéostasie calcique

Des travaux menés chez le rat sur des modèles de MG neurologique induite par le CBE montrent une augmentation de l'efflux du calcium libre des stocks du RE via le récepteur de la ryanodine (RyaR), canaux majoritaires du RE, et ceci en réponse à la caféine, un agoniste de ces récepteurs (242, 244, 260). Le GlcCer module l'activité du RyaR, en le rendant plus sensible et en amplifiant le relargage de $Ca^{2+}$ en réponse à un agent neurotoxique, le glutamate (242). Ce mécanisme augmente la sensibilité neuronale à la mort cellulaire induite par le glutamate et pourrait contribuer ainsi à la perte neuronale dans la MG neuropathique. De plus, la pré-incubation avec des antagonistes de la ryanodine bloque complètement les effets toxiques de nombreuses neurotoxines, démontrant que le relargage de $Ca^{2+}$ du RE via le récepteur RyaR est responsable de la mort neuronale. La GlcSph module elle aussi la libération du $Ca^{2+}$ mais sans impliquer le RyaR. D'autres lyso-glycosphingolipides comme la galactosylsphingosine ou la lactosylsphingosine sont capables de moduler le relargage du

$Ca^{2+}$ *in vitro*, mais à des niveaux 10 à 15 fois supérieurs à ceux retrouvés dans les tissus de patients Gaucher (243).

Dans les tissus cérébraux humains de MG, le relargage de calcium via le récepteur RyaR est plus important dans des microsomes de MG de type 2 que de type 3 ou 1 et semble corrélé au niveau d'accumulation de GlcCer (244).

### 5.5.5 Autophagie

Des anomalies de l'autophagie ont été décrites dans diverses maladies lysosomales, comme la maladie de Niemann-Pick C, le déficit multiple en sulfatase, la maladie de Pompe, ou la mucopolysaccharidose de type VI (261). L'examen anatomopathologique de cerveaux de souris de MG objective la présence d'autophagosomes, impliquant l'autophagie dans les processus neurodégénératifs.

Des fibroblastes de patients déficitaires en saposine C montrent aussi une augmentation de l'induction d'autophagie (262). Des souris portant à la fois la mutation V394L de la GCase et un défaut en Sap-C (souris 4L, C*), utilisées comme modèle de MG neuropathique, montrent une accumulation dans les neurones et les astrocytes de p62/sequestosome 1 impliqués dans la clairance autophagique de protéines ubiquitinylées, ainsi qu'une augmentation de matériel non digéré dans des vésicules à l'intérieur des axones (263).

### 5.5.6 Rôle du facteur de transcription EB (TFEB)

TFEB, facteur de transcription EB, est un régulateur clé dans la biogenèse et les fonctions des lysosomes. TFEB module les voies lysosomales en contrôlant l'expression des enzymes lysosomales impliquées dans la dégradation des protéines, des glycosaminoglycanes, des sphingolipides et du glycogène (264). Il module aussi la clairance cellulaire en contrôlant l'autophagie et l'exocytose lysosomale (265, 266). Dans des fibroblastes de patients Gaucher homozygotes pour la mutation L444P, l'activation de TFEB permet de restaurer le repliement et l'adressage de la GCase au lysosome et augmente ainsi son activité enzymatique (267). La principale réponse transcriptionnelle dans le fibroblaste MG est l'activation du réseau CLEAR, composé de diverses fonctions associées au lysosome et modulées par TFEB, en particulier LIMP2 (267).

### 5.5.7 La voie du récepteur interagissant avec la protéine kinase-3

Une forme de nécrose programmée appelée nécroptose dépend des sérine-thréonine protéines kinases RIPK1 et RIPK3. La nécroptose peut être déclenchée par l'activation des récepteurs

au TNF ou Toll-like (TLR), en réponse au stress génotoxique ou au cours d'infections virales. Le clivage de ces kinases par la caspase-8 prévient la nécroptose et est alors associé à de l'apoptose. Quand la caspase-8 est inactive, RIPK1 et RIPK3 ne sont pas clivées et engagent les mécanismes effecteurs de la nécroptose. L'association de la caspase-8 à l'isoforme longue de c-FLIP (et à FADD) inhibe la nécroptose, tandis que son association avec c-FLIP court la favorise. Deux modèles murins de MG ont révélé des taux élevés de c-FLIP court dans le cerveau, expliquant l'absence d'activité caspase-8. Il a aussi été retrouvé une élévation du c-FLIP long. Ripk1 et Ripk3 sont augmentés dans le cerveau des souris Gaucher (268). Le taux de RIPK1 a également été retrouvé élevé dans le cerveau d'un patient ayant une MG de type 2. Dans le cerveau de souris Ripk3+/- et traitées par CBE, c-Flip court est augmenté et les animaux présentent des manifestations typiques de MG avec perte de poids et perte de la coordination motrice, tandis que les souris Ripk3-/- avec CBE sont considérablement améliorées avec une augmentation de la survie de plus de 100 jours et une amélioration des signes neurologiques. La voie RIPK3 serait impliquée dans la neuro-inflammation. L'atteinte hépatique est aussi améliorée dans les souris Ripk3-/- traitées par CBE, avec moins de cellules de Kupffer CD68+ et une diminution des ALAT (268). Le ratio poids de la rate/poids corporel était également amélioré. Les RIP Kinases semblent donc directement impliquées dans la cascade des événements physiopathologiques des formes sévères de la MG.

## 6. Glucosylcéramide et cancer

### 6.1 Glucosylcéramide synthase et cancer

Il y a vingt ans, le groupe de Cabot montrait une augmentation du contenu en GlcCer dans diverses lignées des cellules chimio-résistantes (cellules de cancer mammaire MCF-7-AdrR, KB-V-1, carcinome épidermoïde résistant à la vinblastine, NIH:OVCAR-3, un adénocarcinome ovarien) (269). Dans ces cellules au phénotype multi-résistant (MRD), une altération du métabolisme du GlcCer est suggérée, en particulier une synthèse accélérée, car la dégradation du GlcCer n'est pas altérée. Une augmentation similaire des taux de GlcCer est documentée dans des échantillons de tumeurs (270). Le tamoxifène, le vérapamil, ou la cyclosporine A, des agents qui réversent le phénotype MDR, sont capables de réduire le contenu en GlcCer. L'inhibition de la synthèse de GlcCer par le tamoxifène est corrélée à sa capacité à sensibiliser les cellules MDR à la chimiothérapie, comme le fait le PPMP (1-phényl-2-palmitoylamino-3-morpholino-1-propanol), un inhibiteur de la GCS (271). Liu et al. montrent que la surexpression de la GCS (activité x11), dans les cellules de cancer du sein

MCF-7 induit un importante résistance à l'adriamycine et au céramide par rapport aux cellules témoins (272). La surexpression de la GCS dans certaines cellules de cancer mammaire comme MCF-7, de cancer du poumon A549 ou des cellules leucémiques HL-60, confère une résistance à la doxorubicine, au TNFα, à la daunorubicine, et au C6-céramide (272-275). De manière analogue, plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (sein, ovaire, colon, cervical, leucémie) multi-résistantes montrent une surexpression de la GCS, 2 à 4 fois plus que dans les cellules sensibles (232, 234-241). Inversement, le "silencing" de la GCS par siRNA ou par des oligonucléotides anti-sens, ou son inhibition par le PDMP ou le Genz-123346, rétablit la sensibilité à des cellules cancéreuses résistantes à diverses chimiothérapies (276, 277).

Chez l'animal, l'administration d'un iminosucre (la N-butyl-déoxynojirimycine, NB-DNJ), inhibiteur de la GCS, retarde le développement d'une tumeur de cellules de mélanome MEB4 (278). De plus, un autre iminosucre OGT2378 inhibe la croissance tumorale orthotopique dans un modèle de souris syngénique sans effet cytotoxique ou proliférative *in vitro* (279). Dans un modèle de xénogreffe de tumeurs MDR, générée par l'inoculation de cellules NCI/ADR-RES à des souris athymiques, l'extinction de la GCS diminue significativement la croissance tumorale et augmente la sensibilité de ces tumeurs à la doxorubicine (280). Cependant, cette résistance induite par la GCS est dépendante du type cellulaire car certaines cellules, comme par exemple, la lignée Jurkat ou le mélanome GM95, ne sont pas sensibilisées à la doxorubicine ou au CD95 par la surexpression de la GCS (281, 282).

Chez les patients, l'augmentation de l'expression de la GCS serait un indicateur de mauvais pronostic dans les cancers du sein, des voies urinaires, des ovaires ou des leucémies (283, 284). Dans les tumeurs mammaires, l'analyse de microarrays sur une large cohorte de 1681 tumeurs, montre que l'expression de la GCS est associée à au statut suivant: positivité du récepteur aux oestrogènes, faible grade histologique, faible niveau de Ki67 et négativité de ErbB2 (285). Une autre étude montre que la GCS est surexprimée dans les cancers du sein métastatiques en comparaison aux non-métastatiques ainsi que dans les cancers du sein positifs pour les récepteurs aux œstrogènes (283). L'expression de la GCS est aussi très associée à HER2 dans les cancers du sein négatifs pour les récepteurs aux œstrogènes. Dans le cancer de la vessie (75 échantillons), la surexpression de la GCS en immunohistochimie est associée à la présence de ganglions lymphatiques métastatiques. La survie totale moyenne à 5 ans et la survie sans progression sont respectivement de 60,3 et 36,2 mois dans le groupe exprimant faiblement la GCS contre 45,1 et 27,3 mois dans le groupe exprimant fortement la

GCS (284). Dans les leucémies (65 patients incluant 22 cas de leucémie aiguë myéloïde, 18 cas de leucémie aiguë lymphoïde, 25 cas de leucémie myéloïde chronique), la GCS détectée par RT-PCR est surexprimée dans le groupe chimio-résistant comparé au groupe chimio-sensible mais aussi MDR1 et Bcl2 (286). Dans le cancer du rein (49 tumeurs), l'analyse en microarray montre qu'un sous-groupe de gènes comprenant la GCS est surexprimé avec une signature génique de « type métastatique » (287).

Les mécanismes de la chimio-résistance liée à la GCS ne sont pas bien connus. Les agents produisant de grandes quantités de céramide endogène ou le céramide à courte chaîne (C6) sont capables d'augmenter l'expression et l'activité de la GCS (288, 289). De plus, la chimiothérapie par doxorubicine active la transcription de la GCS via le facteur Sp1 (290, 291).

La surexpression de la P-glycoprotéine (P-gp) confère une résistance à de nombreuses chimiothérapies comme les vinca alcaloïdes, les anthracyclines, l'épipodophyllotoxine et le taxol (292). P-gp est un transporter de la famille ABC (ABCB1) de 170 kDa codé par le gène humain MDR1. C'est une protéine transmembranaire, exprimée physiologiquement dans de nombreux tissus, qui fonctionne comme une pompe énergie-dépendante pour exporter divers agents cytotoxiques hydrophobes (293). Du céramide (C8-céramide) ou du GlcCer (C8-GlcCer) à chaîne courte est capable d'augmenter le niveau d'ARNm de MDR1 et aussi l'expression de la P-gp (293). La co-administration d'un inhibiteur de la GCS et de C6-céramide peut complètement bloquer l'expression de MDR1 suggérant que le GlcCer (synthétisé à partir du céramide) pourrait participer à l'up-régulation de l'expression du gène MDR1 (293). Dans certaines lignées cancéreuses (carcinome épidermoïde humain, cancer du sein, leucémies et mélanomes), le contenu en GlcCer augmente de manière concomitante à la chimio-résistance, et les taux d'ARNm de la GCS, et des protéines GCS et P-gp augmentent parallèlement. L'activité de la GCS est 15 fois plus élevée dans la lignée de cancer du sein résistante (MCF7-AdrR) que dans la lignée sensible (294). Il a été montré que le "silencing" de la GCS réprime l'expression de MDR1 et que la transfection de l'ADNc de la GCS dans une lignée de cellules cancéreuses ovariennes (OVCAR-8) exprimant faiblement la GCS et P-gp augmente l'expression de MDR1 et l'activité d'efflux de P-gp par la voie cScr et β-caténine (280). Ainsi, la surexpression de la GCS produirait de grandes quantités de GlcCer durant le stress de la chimiothérapie, conduisant ensuite à une augmentation des glycosphingolipides de la série globo (Gb3, Gb5, MSGb5) dans les microdomaines. Cela activerait la kinase cSrc, entraînant la déphosphorylation de la β-caténine et sa localisation

nucléaire (280). L'activation de la β-caténine augmente l'expression de la P-gp (295). Dans le noyau, en présence du facteur Tcf4, un membre de la famille des T-cell factor/lymphoid enhancer factor, la β-caténine pourrait se lier au promoteur de MDR1 et stimuler son expression. En effet, MDR1 a été identifié comme une cible génique directe du complexe Tcf4/β-caténine (296).

## 6.2 Glucosylcéramidases et cancer

### 6.2.1 Glucosylcéramidase lysosomale et cancer

Depuis une trentaine d'années, l'association entre maladie de Gaucher et cancer est rapportée. En effet, l'apparition de maladies hématologiques en particulier des lymphopathies B et les cancers plasmocytaires comme le myélome multiple (MM), les leucémies aiguës ou chroniques, ou encore la maladie de Hodgkin, a été décrite au cours de la maladie de Gaucher, initialement dans des cas cliniques isolés puis dans de courtes séries (297-302). En 1982, un lien causal entre l'accumulation de GlcCer et les cancers est postulé. Lee et al. retrouvent plusieurs tumeurs chez 239 patients ayant une MG (303). Les gammapathies polyclonales avec hypergammaglobulinémie mais aussi les gammapathies de signification indéterminée (MGUS) sont retrouvées dans 41 et 19% des patients, respectivement (304, 305). La MGUS est une état pré-cancéreux prédisposant au MM avec une risque de transformation de 1% par an dans la population générale (306). L'enzymothérapie pourrait être bénéfique dans la survenue et la sévérité des gammapathies dans la MG (305). Cinq cohortes ont étudié les risques de cancer chez les patients Gaucher comparés à une population contrôle. La première étude en 1993 montrait une augmentation du risque de cancer de 3,6 dans une population de 48 patients et un risque multiplié par 14,7 d'avoir un cancer hématologique (307). Etudiant l'incidence des cancers chez 2742 patients Gaucher du registre international (92% de type 1, 80% recevant une ERT), Rosenbloom et al. ont retrouvé un risque relatif de 5,9 de développer un MM et pas d'augmentation des autres cancers par rapport à l'incidence attendue dans la population des USA (308). Cependant, l'âge des patients dans le registre international était inférieur à 55 ans pour 84,8 % des patients. En 2005, Zimran et al. étudient chez 505 patients Gaucher de type 1 d'un seul centre, le diagnostic de cancer en comparaison avec la population appariée par âge du registre national israélien du cancer. Environ 4% des patients ont développé un cancer (principalement des lymphomes, syndrome myélodysplasique et MM) sans différence statistique avec les registres nationaux israéliens. En 2006, De Fost et al. rapportent les résultats d'une étude dans la population de patients Gaucher d'Europe de

l'Ouest (309). Ils retrouvent 14 cancers chez 131 patients Gaucher (63 des Pays-Bas et 68 d'Allemagne). Par rapport à la population générale, ces auteurs retrouvent une augmentation du risque de tout type de cancer de 2,5, pour les cancers hématologiques de 12,7, et en particulier de MM de 51,1 , et pour le carcinome hépatocellulaire (HCC) de 141,3 (309). Le rapport standardisé de mortalité (calculé comme le ratio des cas observés sur les nombres attendus) pour l'HCC est statistiquement de 101,4 mais pas pour les autres cancers en particulier des hémopathies ou le myélome. De plus, l'HCC apparaît en absence d'une cirrhose préexistante. Les MGUS étaient aussi augmentés à 12,6% comparativement à la prévalence de 1-2% dans la population générale. Il n'était pas retrouvé de différence d'activité de la maladie, de statut splénique ou de génotype chez les patients avec ou sans cancer (309).

L'étude de Landgren et al. rapporte un risque élevé pour les lymphomes non hodgkinien (risque relatif de 2,54), pour les mélanomes malins (3,07) et le cancer du pancréas (2,37) chez 1525 patients classés comme Gaucher dans une population de vétérans américains (310). Cependant, la validité de ces résultats est contestable du fait de la méthodologie utilisée, la MG ayant été définie par l'utilisation de l'International Classification of Diseases (ICD-8 et ICD-9CM) avec les codes 272.2 et 272,2 qui incluent des maladies de surcharge lipidique autres que la MG comme les maladies de Niemann-Pick et de Fabry (311). Enfin, la cohorte de Taddei et al. d'une population de 367 patients Gaucher, dont 54% de sujets homozygotes pour la mutation N370S, avec des racines juives Ashkenazes dans 90%, retrouve un risque relatif de 1,8 de développer un cancer, de 3,45 de développer une hémopathie, et en particulier de 25 un MM (312). Il y a aussi un risque augmenté de cancers du sein (1,84) et de mélanome (2,26) (312).

Une analyse combinée des résultats de trois études de cohortes monocentriques (Zimran, de Fost et Taddei) montre un risque relatif de 1,7 de cancer en général et un risque relatif estimé entre 25 et 51,1 de MM et entre 3,5 et 12,7 pour les autres cancers hématologiques (lymphome non-Hodgkinien, maladie de Hodgkin, leucémie aiguë myéloïde, leucémie aiguë lymphoïde, syndrome myélodysplasique) (313).

Les autres cancers retrouvés chez les patients Gaucher étaient : cancer du sein, du colon, du poumon, mélanome, carcinome épidermoïde, cancer de la thyroïde, du pancréas, gliome, astrocytome, glioblastome, cancer du rein, cancer gastrique, carcinome de vessie, carcinome du nasopharynx, carcinome laryngé, cancer de la lèvre, du col, du testicule, dysgerminome, ostéoblastome et sarcome (313).

La physiopathologie du cancer dans la MG reste méconnue. Deux grands types de mécanismes de la cancérogenèse dans la MG peuvent être évoqués. D'un côté, c'est le

microenvironnement dans la MG qui pourrait être responsable du développement tumoral. De l'autre, c'est le déficit enzymatique et l'accumulation de GlcCer qui seraient directement à l'origine de la cancérogenèse. Pour le moment, aucune étude n'a véritablement testé ces deux hypothèses dans des modèles cellulaires ou animaux. Quelles sont les données disponibles actuellement?

- un microenvironnement favorable au développement tumoral

Certains auteurs attribuent un rôle important à la dérégulation immunitaire observée dans la MG (314). En effet, le catabolisme des macromolécules dans les lysosomes est crucial pour la fonction correcte du système immunitaire, comme le soulignent les altérations immunes dans diverses maladies lysosomales (315). Divers acteurs dans le microenvironnement pourraient être impliqués comme les cytokines, les lymphocytes T CD8, les lymphocytes T CD4 régulateurs, les cellules NK, les NKT, les macrophages associés aux tumeurs (TAM), les cellules dendritiques, et les "myeloid-derived suppressor cells" (MDSC).

Chez les patients Gaucher, les taux plasmatiques de certaines cytokines et chimiokines sont élevés : IL-1β, interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra), sIL-2R, IL-6, IL-10, IL-8, IL-18, TNF-α, M-CSF, sCD14, pulmonary and activation-regulated chemokine (PARC, ou CCL-18) (252, 253, 305, 316-319). Cependant, les cytokines IL-6, TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFNγ, IL-1α, IL-2R, IL-3, IL-12p40, IFNα2, LIF, MCP3, M-CSF, SDF1α, et βNGF peuvent aussi être retrouvées à des taux normaux (253, 305, 318, 319). Les patients Gaucher montrent une réponse anormale des lymphocytes T et une diminution de cellules "natural killer" (NK) (319, 320). Les lymphocytes T γδ2 sont aussi réduits avec une production normale d'IFNγ après stimulation (319). De plus, chez ces patients il y a une augmentation importante des T CD4+ mémoire et une diminution des cellules dendritiques myéloïdes et plasmocytoïdes (319, 321). La réduction du pourcentage de cellules dendritiques plasmocytoïdes, produisant de l'IFN par stimulation du TLR9, est corrigée après enzymothérapie (319). Les cellules dendritiques dérivant des monocytes de patients Gaucher, obtenues en culture, ne montrent cependant pas de défauts phénotypiques ou fonctionnels (321).

Les cellules NKT invariables (iNKT) participant à l'immuno-surveillance anti-cancéreuse pourraient être impliquées. Les iNKT sont un sous-groupe de lymphocytes T αβ, ayant une chaîne alpha du TCR invariable, qui reconnaît les lipides antigéniques liés à la molécule CD1d non polymorphique. Plusieurs glycosphingolipides naturels, comme l'α-

galactosylceramide (α-GalCer), l'isoglobotrihexosylcéramide (iGb3) ou des antigènes glycolipidiques de certaines bactéries ont été identifiés comme de potentiels antigènes pour les iNKT. Récemment, il a été montré que le GlcCer endogène fournit un signal majeur au TCR des iNKT (322). L'extinction de la GCS, réduisant la synthèse de GlcCer, résulte en une moindre réactivité et une plus faible réponse des iNKT à des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse, en présence de lipopolysaccharide (LPS) ou de bactéries entières. D'autre part, le silencing de B4GALT6, l'enzyme impliquée dans la conversion du GlcCer en LacCer, augmente l'auto-réactivité et la réponse des iNKT au LPS et à certaines bactéries (322).
On reconnaît actuellement un sous-type de cellules NKT, les cellules NKT de type II, qui contrairement aux NKT de type I, n'ont pas une chaîne invariante et ne reconnaissent pas l'α-GalCer. Une étude récente a montré dans un modèle de souris Gaucher (fond génétique C57B/6) que les cellules NKT de type II, dirigées contre le GlcCer C22:0 et la GlcSph, étaient présentes dans la rate avec une diminution importante des NKT de type I (323). Il y aurait donc une altération de la balance NKT type I/type II. De plus, cette étude retrouve dans une population de 20 patients Gaucher, que les NKT dirigées contre le GlcCer C22:0 et la GlcSph affichent un phénotype mémoire avec CD45RO+ et phénotype T follicular helper (H) compatible avec une activation persistante *in vivo* (255). Les NKT dirigées contre la GlcSph étaient augmentées chez les patients Gaucher comparativement aux témoins tandis que les NKT de type I n'étaient pas affectées. Les NKT dirigées contre la GlcSph étaient corrélées à la chitotriosidase, signe d'activité de la MG, tandis que les NKT dirigées contre la GlcCer ou les NKT de type I n'étaient pas corrélées à la chitotriosidase. De plus, les NKT dirigées contre la GlcSph étaient particulièrement augmentées chez les patients MG n'ayant pas été traités par enzymothérapie, ces cellules diminuant après traitement.

En outre, les molécules de CD1d sont dérégulées dans la MG. En effet, dans les monocytes des patients Gaucher existe une up-régulation de CD1d et des molécules du CMH de classe II (324). De même, une up-régulation de CD1d s'observe dans des cellules mononucléées sanguines de sujets sains ou la lignée monocytaire THP-1 traitées avec du CBE (324). Les cellules THP-1 exprimant fortement le CD1d (traitées par l'acide rétinoïque pour les différencier en macrophages) sont plus stimulantes pour les lymphocytes T CD4+ que les CD8+ en co-culture (325). Le faible nombre de lymphocytes T CD4+ sanguins dans la MG pourrait être expliqué par un épuisement progressif et une perte des CD4+ secondaire à leur activation chronique par les macrophages/monocytes chargés de lipides (325).

Comme évoqué précédemment, les cellules Gaucher affichent un phénotype de macrophages alternativement activés qui n'expriment pas le TNF-α, MCP1, IL-12p40 mais expriment CD163, CCL18, CD36, SIRPα, et la chitotriosidase et de manière hétérogène IL-6 et IL1-RA (251).

La dérégulation immunitaire dans la MG pourrait aussi être en rapport avec les cellules de la moelle osseuse. Les cellules stromales mésenchymateuses (MSC) d'un patient Gaucher (mutation N370S/L444P) accumulent du GlcCer et ont une production élevée d'IL-8, CCL2 et prostaglandines E2 (70). Des cellules MSC normales traitées par CBE montrent aussi une up-régulation des gènes impliqués dans la protéolyse, la réponse inflammatoire (comme le CCL2), l'homéostasie lipidique, le squelette d'actine et d'autres gènes codant pour des protéines lysosomales; en parallèle, des gènes impliqués dans les processus de biosynthèse des phosphoinositides, de l'ubiquitinylation et de réponses transcriptionnelles sont sous-exprimés (70).

Les modèles animaux de MG présentent également une dysfonction du système immunitaire. Le modèle de souris Gaucher $Gba^{L444P/L444P}$ $Ugcg^{+/+}$ montre une inflammation dans le foie, la rate et les poumons sans accumulation de GlcCer (193). De plus, l'ARNm du TNF est 3 fois plus abondant dans le foie des souris mutantes que dans les souris contrôles, celui de l'IL-1β 4 fois plus élevé dans les ganglions, et les IgG sériques sont élevées (193). Dans un autre modèle de MG (D409V/null), est rapportée une augmentation des macrophages et des cellules dendritiques dans le foie, la rate et les poumons avec une augmentation des molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD86, MHC-II). Les lymphocytes T CD4+ sont aussi élevés dans le foie, la rate et les poumons mais pas dans la moelle osseuse (326). Dans ce modèle, les cytokines suivantes sont augmentées: IFNγ, IL-12p40, TNF-α, IL-17A/F, IL-6, TGFβ, tandis que le taux d'IL-4 est normal. Les polynucléaires sont également augmentés dans le foie, la rate et la moelle osseuse probablement en rapport avec l'augmentation d'IL-17 et des chimiokines CXCL1 et CXCL2. Toujours dans ce modèle, l'analyse transcriptomique a montré que les gènes dont l'expression est altérée sont impliqués dans l'activation macrophagique et la réponse immunitaire. La relation directe entre la quantité de GlcCer tissulaire et les altérations du profil d'expression génique indiquerait une implication de réseaux pro-inflammatoires régulés par l'IFNγ et anti-inflammatoires régulés par l'IL-4 selon la progression de la maladie (327).

La sécrétion d'IL-10 est aussi réduite dans les macrophages de souris du modèle L444P/L444P ou celui induit par le CBE, après activation par IFNγ/LPS (328). De même,

dans un modèle conditionnel (inactivation de Gba dans les cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses), existe une dysfonction profonde et spécifique d'organe des cellules immunitaires touchant principalement le thymus avec une maturation de lymphocytes T anormale, un recrutement aberrant des lymphocytes B, une présentation antigénique augmentée et une maturation anormale des thymocytes (329). Récemment dans un modèle murin de MG (modèle conditionnel avec un déficit dans les cellules hématopoïétiques), il a été noté une augmentation des lymphomes B diffus à grandes cellules (11/21) par rapport au groupe contrôle (2/8) (330). Cependant, dans ce modèle les tumeurs hématologiques sont fréquentes chez les souris âgées avec ce fond génétique et d'autres tumeurs lymphoïdes non B non T apparaissent dans les deux ans dans le groupe contrôle, correspondant à l'apparition de 50% de cancers dans le groupe témoin contre 52,4 % dans le groupe Gaucher (330). De manière plutôt surprenante, dans le groupe des souris ayant un lymphome, les animaux avec de grosses tumeurs ont moins de GlcCer et moins de GlcSph que le sous-groupe avec de petites tumeurs (330). Dans ce même modèle, plus récemment, le traitement des souris avec de l'éliglustat pendant 3 à 10 mois à partir de l'âge de 6 semaines, diminue la protéine monoclonale et la lymphoprolifération. Dans le groupe traité, il n'est pas retrouvé de plasmocytome ou de lymphome, tandis qu'il est retrouvé un lymphome dans 14 cas sur 60 et une protéine monoclonale dans 18 cas sur 44 chez les souris Gaucher non traitées (331).

- le trouble métabolique directement à l'origine des néoplasies

Dans la seconde hypothèse, la cancérogenèse pourrait être en rapport direct avec l'accumulation de sphingolipides comme le GlcCer et/ou à une diminution des taux de céramide, résultant dans un déséquilibre en faveur de la prolifération cellulaire. En effet, comme décrit plus haut, une élévation du GlcCer s'observe dans diverses lignées résistantes (269). Le GlcCer stimule la prolifération au niveau de l'épiderme murin (332). La prolifération de cellules MDCK augmente après traitement par du CBE (333). Par ailleurs, le GlcCer et le LacCer sont augmentés dans la polykystose rénale humaine autosomique dominante (PKD) et dans un modèle murin de PKD (334). L'ajout de LacCer ou de GlcCer peut également augmenter la prolifération de cellules du tubule proximal (335). Une autre étude montre que le GlcCer et le GM3 mais pas le céramide sont augmentés dans la PKD humaine et dans le modèle murin de PKD (334). La déplétion en GlcCer et GM3 dans les cellules épithéliales rénales de rat par un inhibiteur de GCS ou par un siRNA ciblant la GCS retarde la progression du cycle cellulaire *in vitro* et bloque la prolifération *in vivo* dans les modèles de PKD (334). De plus, le CBE à 1 μM pendant 24h dans les cellules MCF7 et

MCF7R (MCF7 résistantes à l'adriamycine) est capable de diminuer la cytotoxicité de la daunorubicine (336). Un test de criblage par ARN interférence pour identifier les gènes influençant la sensibilité de divers cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques, a permis de montrer que le silencing de la GBA1 favorise la résistance au paclitaxel dans trois lignées cellulaires (A549, MDA-MB-231, HCT-116) (337). Le siRNA contre la GBA1 prévient la décroissance d'Akt phosphorylée induite par le paclitaxel, favorisant la survie cellulaire (337).
Le GlcCer exogène est aussi capable de bloquer l'assemblage de la NADPH oxydase 2 en réponse à des chimiothérapies dans certaines cellules cancéreuses (glioblastome et neuroblastome) (338). Les NADPH oxydases sont des oxydoréductases qui jouent un rôle important dans et les voies de signalisation de la mort cellulaire impliquant des phénomènes d'oxydoréduction.

La GBA1 semble jouer un rôle majeur dans la formation de céramide par la voie de "sauvetage" (ou de "recyclage") de la sphingosine. En effet, le céramide provenant de l'hydrolyse du GlcCer par la GCase lysosomale peut être converti en sphingosine dans le lysosome par la céramidase acide; ensuite, la sphingosine peut quitter le lysosome et être recyclée pour former du céramide par l'action de céramide synthases. Des cellules de cancer du sein traitées avec un puissant activateur de protéine kinase C (PKC), le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), renferment moins de GlcCer et plus de céramide (principalement C16:0) (339). Le siRNA de la GBA1 diminue de 50% la formation de céramide induite par le PMA et bloque la dégradation de GlcCer et la formation de sphingosine (339). Les autres 50% de céramide proviendraient de l'action de la sphingomyélinase acide. Inversement, la surexpression de la GBA1 augmente le niveau de céramide. La voie de sauvetage du céramide est liée à l'activation de la PKCδ, qui stimulerait la dégradation du GlcCer et de sphingomyéline. L'apoptose des cellules cancéreuses induite par les agents chimio-thérapeutiques comme l'étoposide ou le paclitaxel, implique l'activation de la PKCδ conduisant à la formation précoce et transitoire du céramide par la synthèse *de novo* mais aussi une formation tardive et soutenue de céramide par la sphingomyélinase acide (340). Sachant que la PKCδ favorise la formation de céramide dépendante de GBA1, la GBA1 pourrait contribuer à l'apoptose induite par les agents chimothérapeutiques et médiée par le céramide (339).

Des siRNA dirigés contre GBA1, mais pas contre GBA2, augmentent la production d'IL-6 dans les cellules MCF-7 sous l'effet du PMA. Le siRNA de GBA1 de même que l'inhibition pharmacologique par CBE favorisent la phosphorylation de p38 MAPK après traitement par PMA (341). Le silencing de la MAPK p38δ atténue significativement l'hyperproduction d'IL-6 dans des MCF-7 traitées par le siRNA contre GBA1 et par PMA (341). Réciproquement, la surexpression de la MAPK p38δ active la synthèse d'IL-6.
En résumé, la GBA1 pourrait jouer un rôle clé dans la cellule cancéreuse elle-même en modulant l'état de prolifération, la production de cytokines et la chimiosensibilité.

Une autre hypothèse sur le lien entre cancer et MG fait intervenir l'α-synucléine. En effet, les mutations de la GBA1 constituent le risque le plus important pour le développement de la maladie de Parkinson, dans laquelle l'α-synucléine est impliquée. De plus, il y a une association épidémiologique entre la maladie de Parkinson et le mélanome (342). L'expression de l'α-synucléine est retrouvée aussi dans une variété de tumeurs cérébrales et divers cancers comme ceux de l'ovaire, du sein, du colon et le mélanome. La croissance de cellules de mélanome B16 et d'adénocarcinome glandulaire mammaire (E0771) est augmentée dans des souris transgéniques exprimant la forme A53T de l'α-synucléine humaine (343, 344). L'α-synucléine est détectée dans des tumeurs B16 développées chez ces souris mais pas dans les tumeurs développées chez des souris contrôles. L'α-synucléine purifiée exogène peut être captée par les cellules tumorales (mélanome, cancer du poumon, et adénocarcinome mammaire). De plus, la surexpression de l'α-synucléine dans le mélanome B16 et dans l'adénocarcinome du sein favorise aussi la prolifération (344).

En cas de mutations de GBA1, les processus d'ERAD pourraient aussi participer à la survenue de cancers, la GCase retenue dans le RE pouvant occuper les E3 ubiquitine ligases, les détournant de leur rôle dans la dégradation d'oncoprotéines qui, à leur tour, s'accumuleraient (82).

Enfin, l'intervention de gènes modificateurs a été proposée pour expliquer les extraordinaires variations phénotypiques dans la MG (345). En effet, parmi les patients ayant le même génotype de la GBA1, une importante variabilité dans la sévérité de l'atteinte clinique existe au sein même d'une fratrie voire chez des jumeaux monozygotes (346-348). Récemment,

certains gènes ont été décrits comme candidats de gènes modificateurs dans la MG. Ces modificateurs génétiques pourraient aussi participer à l'émergence de cancers dans la MG.

### 6.2.2 Glucosylcéramidase non lysosomale et cancer

L'étude de la GBA2 dans le mélanome montre que diverses lignées de mélanome ont de faible quantité d'ARNm de GBA2 comparées à des cellules normales (349). L'activité GBA2 est également plus basse dans les mélanomes que dans les mélanocytes. L'induction d'expression de GBA2 dans les cellules de mélanome (A375) conduit à l'augmentation de la dégradation du GlcCer (diminution de 78%) et à la formation de céramide (C16 et C24). Cela résulte dans l'inhibition de la prolifération des cellules de mélanome *in vitro*, mais également *in vivo*, une inhibition de la croissance de 40% lorsqu'elles sont injectées en sous-cutanée à des souris nude (de 40%) (349). L'expression de GBA2 active un stress du RE conduisant à l'apoptose des cellules de mélanome (349).

### 6.2.3 La protéine apparentée à Klotho et cancer

L'analyse du gène Klotho chez trois patients avec un cancer du rein montre un taux faible d'ARNm de Klotho dans la tumeur ainsi qu'autour de la tumeur, de la même façon qu'un autre klotho gene like, appelée protéine β-glucosidase-like 1 cytosolique (cBGL1) (350). Par ailleurs, le silencing de GBA3 dans des cellules de carcinome colique humain (HCT-116) favorise la résistance au paclitaxel et atténue l'arrêt mitotique (337). Dans le contexte de la métaplasie intestinale (IM), un état précurseur des tumeurs digestives, une analyse du profil d'expression génique de lésions métaplasiques de patients a retrouvé une up-régulation de GBA3 parmi les 25 gènes significativement surexprimés (351).

# TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX

## 1. Objectif général de la thèse

La maladie de Gaucher est la sphingolipidose la plus fréquente. Elle est associée sur le plan épidémiologique à une augmentation du risque de cancers, dont le mélanome. La MG s'accompagne d'un stockage des sphingolipides, le glucosylcéramide et la glucosyls-phingosine, principalement dans les organes hématopoïétiques. Les sphingolipides sont des effecteurs bioactifs impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires dont la prolifération et l'apoptose. Nous formulons l'hypothèse que l'augmentation du GlcCer et/ou le déséquilibre Céramide/GlcCer produit par le déficit en GCase pourrait contribuer au développement tumoral. Dans l'état actuel des connaissances, les mécanismes responsables de la surreprésentation des cancers dans la maladie de Gaucher restent inconnus. On ignore si c'est l'excès de GlcCer dans la cellule cancéreuse qui intervient dans la physiopathologie ou bien les modifications du microenvironnement tumoral dans la maladie de Gaucher. L'objectif de la thèse est donc de mieux préciser les liens physiopathologiques entre la maladie de Gaucher et le développement des cancers et en particulier du mélanome. Dans une approche *in vitro*, nous avons évalué le comportement des cellules de mélanomes que l'on a rendues déficitaires en GBA1 et dans une approche *in vivo*, nous avons évalué le comportement de cellules de mélanomes implantées dans des souris Gaucher par rapport à celles implantées dans des souris contrôles.

## 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 2.1 Cellules

Les cellules de mélanome murin B16F10 (issues de souris C57BL/6) proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection). Elles ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère à 5% de $CO_2$ en milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies) contenant 10% de sérum de veau foetal.

Les cellules de mélanome humain A375 proviennent aussi de l'ATCC et ont été cultivées comme les cellules B16.

### 2.2 Transfection des shRNA

La lignée A375 a été transfectée de façon stable par des shRNA dirigés contre GBA1 humain (Mission shNRA NM-000157/TRCN0000029298, Sigma-Aldrich), clonés dans le plasmide pLKO-1 permettant une sélection stable à l'aide de la puromycine. Les cellules ont été ensemencées en plaques de 6 puits et à 90% de confluence, puis transfectées par la méthode

aux liposomes (Lipofectamine 2000, Invitrogen). Le plasmide (4 μg) a été mis en présence de 10 μl d'agent de transfection pendant 20 mn puis le mélange ajouté aux cellules. Après 48 h, l'agent de sélection, la puromycine, a été ajouté à la concentration de 1 μg/ml. Des transfectants stables ont été isolés par dilution limite.

**2.3 Tests de viabilité cellulaire**

La viabilité cellulaire a été évaluée par un test colorimétrique au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT, Euromedex). 100000 cellules/ml ont été ensemencées en plaques de 96 puits en milieu DMEM contenant différentes concentrations de sérum. Après un temps d'incubation variable, une solution de MTT à 0,5 mg/ml a été ajoutée. Les cristaux de formazan ont été dissous par addition de 100 μl de SDS 10% HCl 0.01N sur la nuit. L'intensité de la coloration a été mesurée par spectrophotométrie à 590 nm.

**2.4 Formation des sphéroïdes**

Après ajout de milieu DMEM contenant 5% d'agarose dans une plaque de 96 puits, 3000 cellules en suspension dans du DMEM contenant 10% de sérum ont été déposées dans les puits ainsi précoatés. Après 6 jours d'incubation à 37°C, les sphéroïdes obtenus ont été photographiés.

**2.5 Animaux**

Deux modèles de souris Gaucher de type 1 ont été utilisés, obtenus grâce à l'amabilité du Dr G.A. Grabowski (Cincinnati, Ohio). Le premier modèle consiste en une souris homozygote pour la substitution D409V (souris 409/409), générée sur un fond génétique C57BL/6-129SvEvBrd (194). L'autre modèle est une souris hétérozygote composite Null/D409V (Null/409) obtenue par croisement d'une souris wt/Null avec une souris D409V/D409V (194). La souris 409/409 a un fond génétique composé de 50% de C57BL/6J et 50% de 129SvEvBrd, tandis que la souris Null/409 a un fond génétique composé de 50% FVB, 25% C57BL/6J et 25% 129SvEvBrd. Selon le modèle Gaucher testé, les souris contrôles (wt) utilisées étaient soit sur un fond génétique double (C57BL/6-129SvEvBrd) soit sur un fond génétique triple (50% FVB, 25% C57BL/6J et 25% 129SvEvBrd). Toutes les souris ont été élevées dans des conditions sans pathogènes spécifiques dans le centre d'élevage (CREFRE, Toulouse) avec des procédures standardisées de l'INSERM. Pour obtenir les différentes lignées d'animaux, nous avons ainsi élevé des souris: D409V/D409V femelles,

D409V/D409V mâles, wt/wt femelles, wt/wt mâles, wt/null femelles, wt/null mâles). L'expérimentation animale a été menée en conformité avec la règlementation, après approbation du protocole par le comité d'éthique Midi-Pyrénées.

**2.6 Génotypage**

**- Extraction d'ADN**

L'ADN est extrait à partir d'un prélèvement de queue de souris dans un tampon de lyse (10 mM de Tris pH 8,5, 5 mM d'EDTA, 200 mM NaCl, 0,2% SDS, 100 μg/ml de protéinase K) pendant une nuit à 55°C. Après purification au phénol saturé et chloroforme contenant de l'alcool isoamylique, l'ADN est précipité avec deux volumes d'éthanol contenant 0,3 M d'acétate de sodium, lavé à l'éthanol 70%, séché puis resuspendu dans 30 μl d'$H_2O$.

**- Amplification par PCR**

L'ADN a été analysé par PCR en utilisant d'une part le couple mG4995F, amorce sens située dans l'intron 8 (5'-CACAGATGTGTATGGCCATCGG-3') et mG538R, amorce antisens située dans l'exon 9 (5'-TGAAGTGGCCAAGATGGTAG-3'). Ce couple d'amorces génère un fragment de 391 paires de bases (pb) sur l'ADN wt et un fragment de 485 pb (391+94 pb de la séquence loxP) sur l'ADN portant la mutation D409V. Une seconde PCR est réalisée avec les amorces Ex9F, amorce sens dans l'exon 9 (5'GAACCTCCTTTACC-ACGTAACTGG-3'), gv4083F, amorce sens dans la cassette néo (5'-GGCCTACCCGCTTCCATTGCT) et Mex10R, amorce antisens dans l'exon 10 (5'-GTGCTCTCACTGGCCACCAACG-3'). Le couple Ex9F/Mex10R produit un fragment de 550 pb pour l'allèle wt et le couple gv4083/Mex10R génère un fragment de 430 pb sur l'allèle Null. Les conditions d'amplification sont les suivantes : 1 mn à 94°C, 1 mn à 56°C, 1 mn à 72°C pendant 35 cycles, suivis d'un cycle de 7 mn à 72°C. Les amplicons produits ont été analysés après séparation sur gel d'électrophorèse d'agarose (10%) et visualisation par imprégnation au SYBR Green I.

**2.7 Analyse de la croissance tumorale**

Après culture, des cellules B16F10 ($3x10^5$) ont été récoltées, mises en suspension dans du PBS puis injectées par voie sous-cutanée (ou par voie intra-dermique dans certains cas) dans le dos de la souris. Environ tous les 3 jours, le volume tumoral a été mesuré et calculé en utilisant un pied à coulisse (en utilisant la formule : volume = 0,52 × longueur × largeur). Les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale après anesthésie au chloroforme, puis les

tumeurs et les différents organes (foie, rate, thymus) ainsi que des échantillons de sang ont été prélevés.

**2.8 Cytométrie en flux**

Les suspensions cellulaires de thymus, rate et foie ont été obtenues après broyat des organes dans du PBS + 2% SVF avec le piston d'une seringue de 2 ml, et filtration sur tamis de 40 µm (Cell Strainer, BD). Les érythrocytes sont éliminés des suspensions de splénocytes par choc hypotonique dans une solution tamponnée de chlorure d'ammonium (144 mM $NH_4Cl$ + 17 mM Tris, pH 7,2) pendant 5 min à température ambiante.

Pour préparer les lymphocytes hépatiques, les foies ont été perfusés *via* la veine porte avec 10 ml de PBS froid, puis disséqués et broyés sur un tamis de 70 µm (Cell Strainer, BD). Le filtrat a été centrifugé 5 min à 1300 rpm, et lavé deux fois avec du milieu DMEM complet. Le culot ainsi obtenu a été remis en suspension dans 25 ml d'une solution de Percoll (Sigma-Aldrich) à 30% (v/v) dans du RPMI 1640, puis déposé sur 20 ml d'une solution de Percoll à 70% et centrifugé 20 min à 3000 rpm à 4°C.

Pour analyser les lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL), les tumeurs ont été digérées avec de la collagénase D (1 mg/ml, Roche Diagnostics) en présence de DNase (0.05mg/ml, Roche Diagnostics) pendant 30 min à 37°C sous agitation, puis filtrées à l'aide d'un tamis cellulaire de 70 µm (Cell Strainer, BD).

Après blocage des récepteurs Fcγ par l'anticorps 2.4G2, les cellules ont été marquées en utilisant des anticorps mAbs anti-CD3 (clone 145-2C11), CD4 (GK1.6), CD8 (clone 53-6.7) et NK (eBioscience). Le marquage spécifique des lymphocytes iNKT a été réalisé grâce aux tétramères de CD1d murins, chargés avec l'analogue d'α-GalCer PBS-57 (NIH Tetramer Core Facility), conjugués au fluorochrome APC, obtenus grâce au Dr Lennart Mars (CPTP, Toulouse).

Les cellules mortes ont été exclues de l'analyse grâce à un marquage avec du réactif LIVE/DEAD Fixable Aqua (Life Technology). L'expression des différents marqueurs a été évaluée sur un cytomètre BD LSR Fortessa (BD Biosciences) et analysée en utilisant le programme DIVA.

**2.9 Mesure de l'activité enzymatique**

Des fragments d'organes ont été broyés avec un homogénéiseur Ultra-Turrax, puis soniqués et centrifugés à faible vitesse. En ce qui concerne les cellules, les culots cellulaires ont été repris par un faible volume d'eau et soumis à sonication (sonicateur à mèche) pendant quelques

secondes, à 4°C. Après dosage du contenu en protéines par la méthode de Bradford, l'activité enzymatique a été déterminée (sur 15 et 30 µg de protéines). Le substrat fluorescent 4-méthylumbelliféryl-β-D-glucopyranoside (Fluka) (1,8 mg/ml), préparé dans du tampon citrate/phosphate pH 5,5, 20 mM, est ajouté au lysat puis incubé à 37°C pendant 1 heure. La réaction enzymatique est stoppée avec 2 ml de tampon glycine/NaOH 0,5 M pH 10,5. La lecture au fluorimètre a été réalisée en réglant les longueurs d'onde d'excitation à 358 nm et d'émission à 448 nm; le signal de fluorescence enregistré a été comparé à celui émis par des concentrations connues de 4-méthylumbelliférone. L'activité spécifique de la GCase a été calculée et exprimée en nmol/h.mg de protéines.

**2.10 Western blot**

Les culots cellulaires ont été resuspendus dans un tampon de lyse contenant un cocktail d'anti-protéases (Roche), soniqués et centrifugés à 4°C pendant 15 min à 12000g. La concentration protéique a été déterminée selon la méthode de Bradford. Les extraits protéiques (40 µg de protéines dénaturées) ont été soumis à séparation par électrophorèse dans un gel dénaturant de polyacrylamide (à 12%). Après transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose, la membrane a été saturée pendant 1 h avec une solution saline TBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl) contenant 0,1% de Tween-20 et 5% de lait écrémé. La GCase a été détectée par un anticorps monoclonal de souris fourni par Abcam (ref. ab55080) incubé toute la nuit à 4°C. Un anticorps anti-β-actine de Cell Signaling (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France) a été employé pour contrôler la charge en protéines. La révélation a été réalisée après incubation avec un anticorps secondaire couplé à une peroxydase (HRP) et addition de son substrat chimiluminescent (ECL, Pierce).

**2.11 Analyse des lipides par chromatographie sur couche mince**

Les échantillons de foie (300 mg) ont été broyés dans de l'eau (600 µl) avec un homogénéiseur Ultra-Turrax, puis traités par sonication et centrifugés 15 min à 12000 g à 4°C. Les lipides du surnageant (500 µl par échantillon) ont été extraits par la méthode de Folch (352) avec un mélange chloroforme/méthanol, 2:1 (vol/vol), puis séparés par chromatographie sur couche mince (silica gel 60, Merck) par deux phases mobiles successives constituées par le mélange chloroforme/méthanol/ammoniac/eau (70:3:1,7:2,5) puis le mélange chloroforme/méthanol/acide acétique (94:1:5). La révélation colorimétrique a été

réalisée avec de l'orcinol après séchage de 10 min dans un four à 100°C; les glycolipides ainsi colorés apparaissent en violet.

**2.12 Analyse des lipides par spectrométrie de masse**

Les lipides contenus dans des fragments de 25 mg de foie ou de rate ont été extraits selon la méthode de Bligh et Dyer (353) dans le mélange dichlorométhane/méthanol à 2% d'acide acétique/eau (2,5:2,5:2). Après centrifugation à 1500 rpm pendant 3 min, la phase organique a été collectée et séchée sous flux d'azote, puis dissoute dans 50 µL de méthanol. L'extrait a été conservé à -20°C avant l'analyse en chromatographie liquide (Agilent 1290 Infinity) couplée à la spectrométrie de masse (triple quadrupole MS (Agilent 6460) à ionisation électrospray). La détection des pics, l'intégration et l'analyse quantitative utilisent le programme Mass Hunter Quantitative analysis (Agilent Technologies, USA). La méthode ici décrite est celle de Munoz-Olaya et al. (354) et a été réalisée sur la plateforme de lipidomique MetaToul) (Inserm U1048, Toulouse).

**2.13 Analyses statistiques**

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

# 3. Résultats expérimentaux

## 3.1 Développement d'un modèle cellulaire de maladie de Gaucher dans la cellule de mélanome.

Afin de tester tout d'abord l'hypothèse selon laquelle ce n'est pas le microenvironnement Gaucher qui favorise la prolifération tumorale, mais le fait que la cellule néoplasique émergente chez un patient ayant une MG pourrait avoir des particularités favorisant sa prolifération, nous avons voulu rendre des cellules de mélanome déficientes pour la GBA1. Nous avons ainsi créé un modèle de MG dans une lignée de mélanome.

Ainsi, nous avons transfecté ou non un shRNA dirigé contre le GBA1 humaine dans des cellules de mélanome humain A375. Nous avons ainsi obtenu après sélection par la puromycine des cellules dites Ash et certains clones par technique de dilution limite : clones Ash1, Ash 2, Ash3, Ash4, Ash5 et Ash8.

Les résultats montrent que dans deux clones Ash1 et Ash2, l'expression de la protéine GBA et son activité enzymatique béta-glucosidase acide sont diminuées (Fig. 4A et 4B). En l'absence ou en présence de faibles concentrations de sérum bovin, le nombre de cellules viables en culture bi-dimensionnelle est plus grand dans les clones déplétés en GBA1 (Fig. 5). De plus, dans des conditions de culture en agar tridimensionnelle, les clones ayant une expression réduite de GBA1 forment des agrégats relâchés qui sont moins délimités que les sphéroïdes formés par les clones contrôles (Fig. 6). Ces données suggèrent que l'activité GBA1 diminuée pourrait favoriser la cellule cancéreuse à survivre à des conditions de stress. Ces effets pourraient être en rapport avec soit une augmentation du contenu en GlcCer soit une diminution du céramide dans les clones avec GBA1 diminuée.

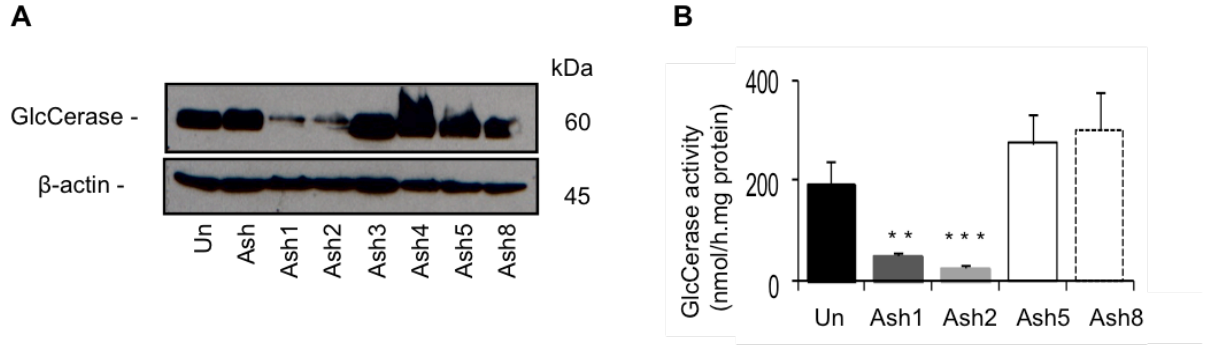


**Figure 4** : Effet du silencing de GBA1 sur la croissance des cellules de mélanome humain A375. Les cellules non transfectées (Un) et les cellules transfectées par le shRNA (pool Ash et clones Ash1, Ash2, Ash3, Ash4, Ash5 et Ash8) sont testées pour : A, l'expression de GBA1 par Western Blot ; B, l'activité enzymatique de la GCase avec un substrat fluorogénique (n=3).

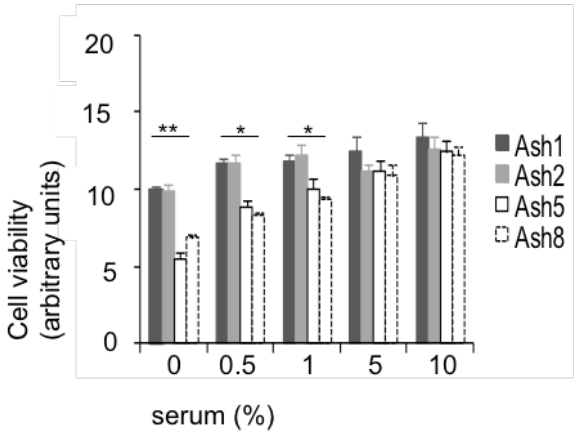


**Figure 5** : **Effet du silencing de GBA1 sur la viabilité du mélanome humain A375 en privation de sérum**. Les cellules non transfectées (Un) et les cellules transfectées par le shRNA (pool Ash et clones Ash1, Ash2, Ash3, Ash4, Ash5 et Ash8) sont testées pour la viabilité cellulaire par MTT, après 3 jours en culture en variant les concentrations de sérum (n=5). Les astérisques indiquent les différences significatives entre les clones Ash1 ou les clones Ash2 et les clones Ash5 ou Ash8 (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

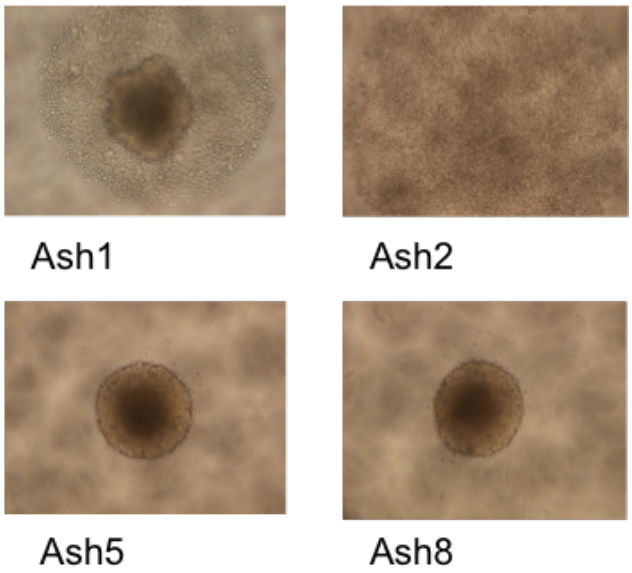


**Figure 6** : **Effet du silencing de GBA1 sur la capacité du mélanome humain A375 à former des sphéroïdes**. Nous avons préparé des boîtes de 96 puits contenant du milieu DMEM et 5% d'agarose. Puis, nous avons déposé dans les puits précoatés 3000 cellules en suspension dans du DMEM contenant 10% de sérum. Après 6 jours d'incubation à 37°C dans une atmosphère à 5% de $CO_2$, les sphéroïdes obtenus étaient photographiés. Les images sont représentatives de trois expériences indépendantes. Les clones Ash1 et Ash2 montrent des différences dans leur capacité à former des sphéroïdes par rapport aux clones Ash5 et Ash8.

## 3.2 Développement d'un modèle animal de cancérogenèse dans la maladie de Gaucher

### 3.2.1 Les modèles de souris Gaucher pour la cancérogénèse présentent un déficit en GCase

Les modèles de souris Gaucher que nous avons sélectionnés pour les études de tumorigenèse ont été évalués pour l'activité de la β-glucosidase acide et le degré de surcharge lipidique.

Nous avons analysé des échantillons de tissus des souris adultes sauvages (wild-type; wt/wt), de souris hétérozygotes pour la mutation D409V (409/wt) et de souris homozygotes D409V (409/409) de fond génétique double (cf. Matériels et méthodes). Dans le foie (Fig. 7, A) comme dans la rate (Fig. 7, C), l'activité de la GCase est significativement diminuée chez les souris homozygotes D409V par rapport aux souris hétérozygotes (409/wt). De même, chez les souris ayant un triple fond génétique, l'activité de la GCase est déficitaire dans le foie (Fig. 7, B) et la rate (Fig. 7, D) des souris 409/null comparée à celle des souris hétérozygotes ou sauvages.

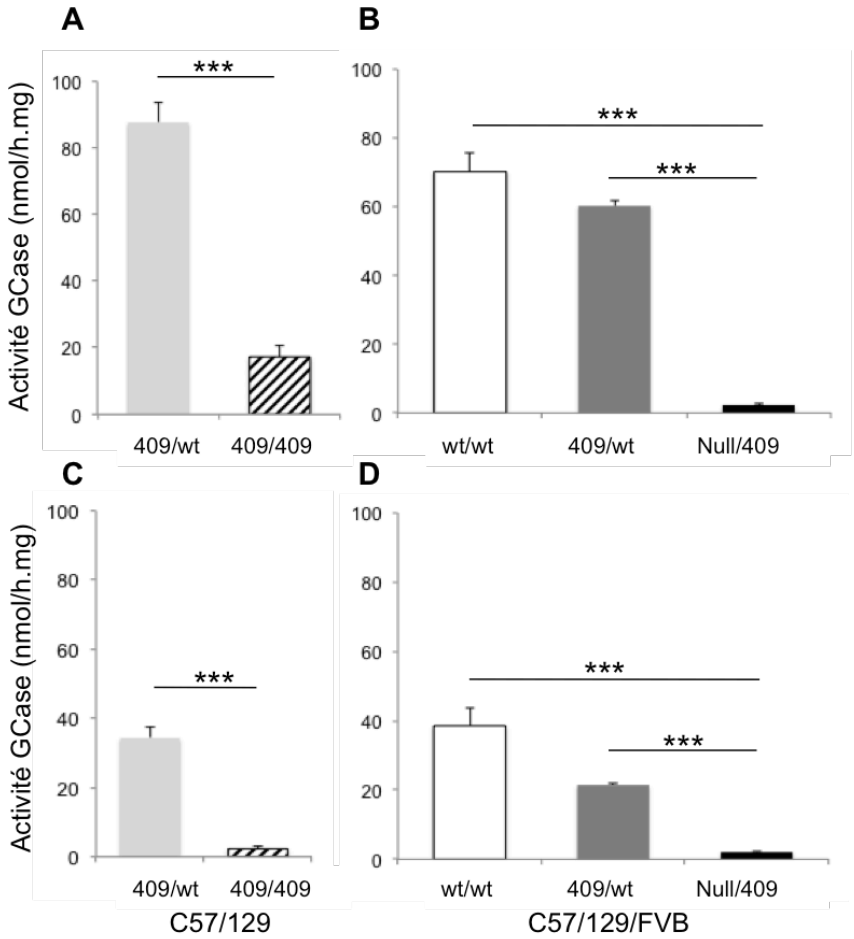


**Figure 7 Activité de la ß-glucosidase acide dans les organes des souris.** L'activité GCase a été déterminée sur des lysats de foie (A et B) et de rate (C et D), isolés de souris wild-type (wt/wt), hétérozygotes (409/wt) ou homozygotes (409/409) pour la mutation D409V, et des souris D409V/null (Null/409). Le fond génétique est indiqué au-dessous de chaque figure. Chaque test d'activité a été réalisé en double; les résultats sont donnés en moyennes ± SEM sur au moins 3 à 6 souris âgées de 18 à 22 semaines

### 3.2.2 Les modèles de souris Gaucher pour la cancérogenèse ont une surcharge en glucosylcéramide et en glucosylsphingosine dans le foie et la rate

L'analyse des lipides par spectrométrie de masse à haute résolution montre une accumulation de GlcCer dans le foie (Fig. 8, A) et la rate (Fig. 8, C) des souris homozygotes (409/409) de

18-21 semaines par rapport aux souris hétérozygotes à double fond génétique. Les organes des souris Gaucher présentent également une surcharge nette en glucosylsphingosine. De plus, l'analyse des sphingolipides par chromatographie sur couche mince révèle aussi une accumulation de GlcCer dans le foie des souris 409/null par rapport aux souris 409/wt et wt/wt à triple fond génétique (Fig. 8, B).

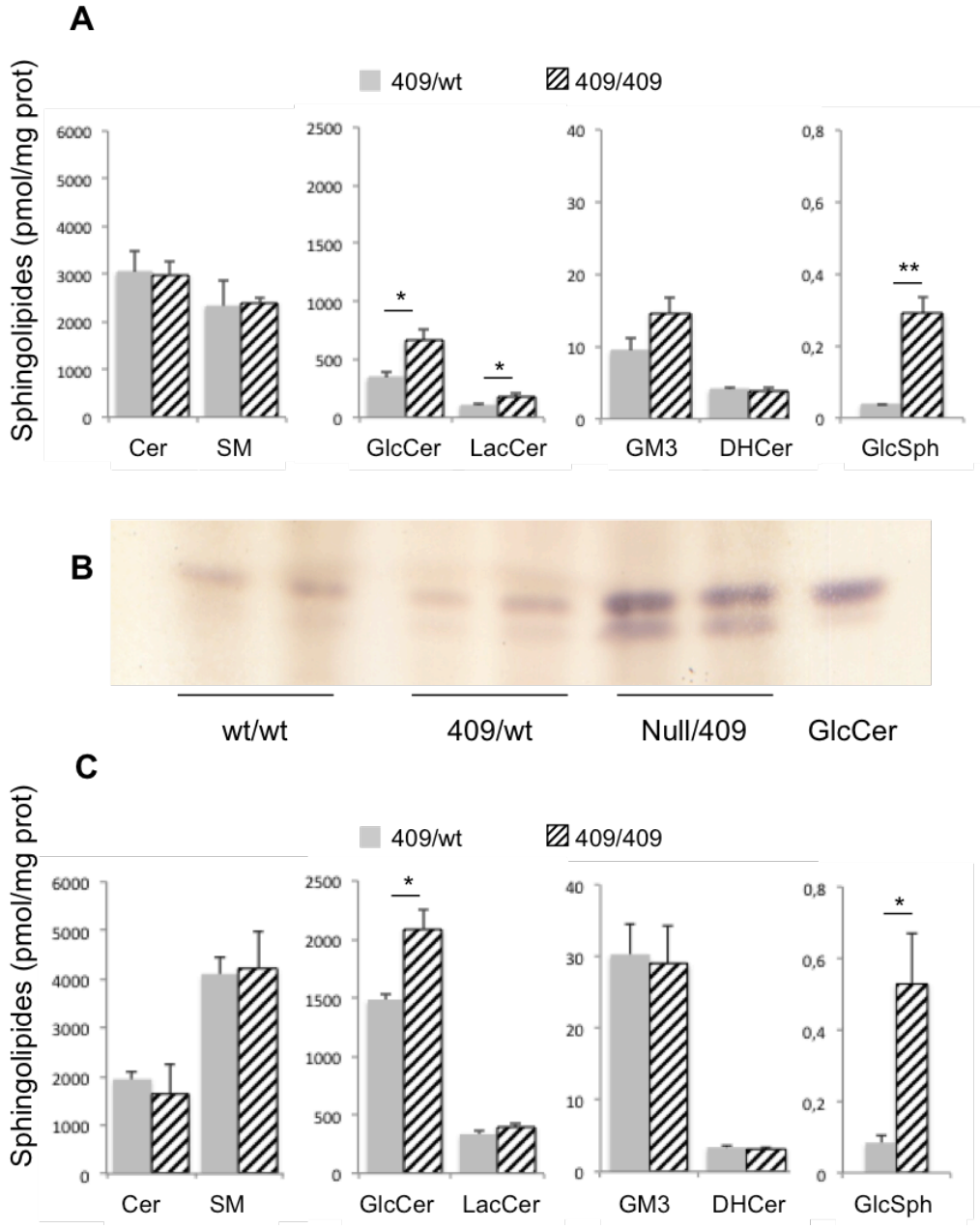


**Figure 8 : Contenu en sphingolipides des organes des souris.** Les lipides ont été extraits à partir du foie (A et B) et de la rate (C) de souris sauvages, hétérozygotes D409V (409/wt) ou homozygotes (409/409) ou 409/null, âgées de 18 à 21 semaines. Les sphingolipides ont été quantifiés par spectrométrie de masse haute résolution (A et C). Les données sont exprimées en moyennes ± SEM des 4 animaux par groupe. Alternativement, les sphingolipides ont été évalués par chromatographie sur couche mince, les glycolipides étant marqués par l'orcinol (B).

### 3.2.3. La croissance tumorale des cellules de mélanome est accrue chez les souris Gaucher femelles (409/409)

Afin d'évaluer le rôle d'un microenvironnement Gaucher dans la tumorigenèse, des cellules cancéreuses d'origine murine et dérivant de souris C57BL/6 ont été injectées par voie sous-cutanée à des souris homozygotes ou hétérozygotes (servant de contrôle) pour la mutation D409V de *Gba1*. Pour cela, nous avons utilisé des cellules de mélanome B16F10. L'analyse des tumeurs montre une augmentation significative du volume tumoral chez les souris femelles homozygotes (409/409) par rapport à leurs congénères hétérozygotes (Fig. 9, A). Le poids des tumeurs, mesuré à différents temps dans différentes expériences et exprimé en pourcentage de celui observé chez les contrôles, est lui aussi augmenté chez les souris Gaucher de 380 à 580% (Fig. 9, B). Quant au poids de la rate chez ces animaux Gaucher femelles, à leur âge (19 à 24 semaines), il n'est pas significativement différent de celui de la rate des souris contrôles (Fig. 9, C).

### 3.2.4. La croissance tumorale des cellules de mélanome est augmentée chez les souris Gaucher mâles (409/409)

Comme décrit ci-dessus, des cellules de mélanome B16F10 ($3x10^5$) ont été implantées en sous-cutané à des souris mâles Gaucher homozygotes (409/409) ou hétérozygotes (409/wt). L'analyse du volume tumoral révèle une augmentation significative chez les souris Gaucher mâles (Fig. 9, D). Il en est de même pour le poids des tumeurs, mesuré à différents temps, qui est augmenté de 170 à 320% chez les souris Gaucher mâles par rapport aux souris contrôles (Fig. 9, E). Chez les souris Gaucher, par rapport aux animaux témoins du même âge, le poids de la rate est supérieur (Fig. 9, F).

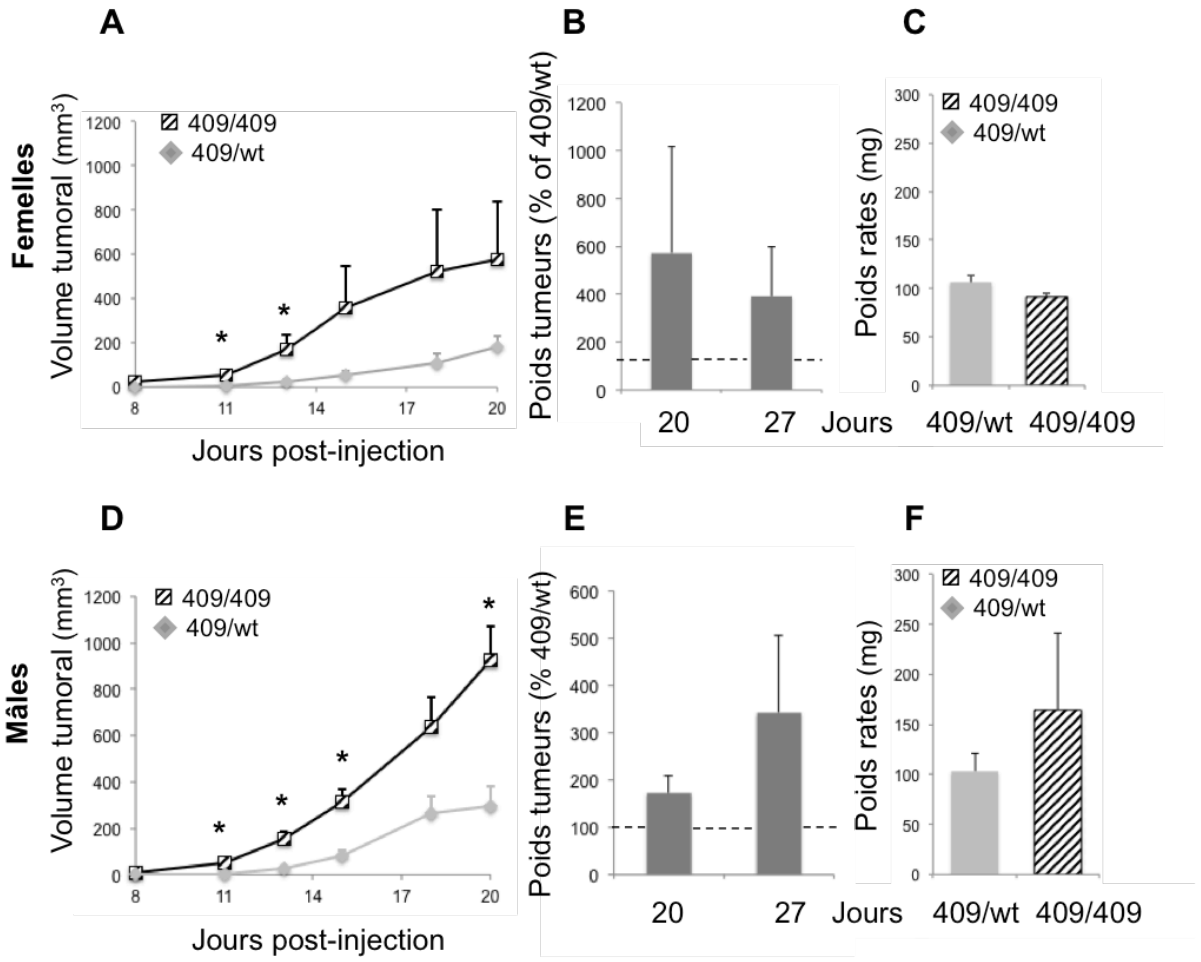


**Figure 9 : Croissance des tumeurs de mélanome chez des souris Gaucher (fond génétique double C57/129).** Des cellules B16F10 ($3X10^5$) ont été injectées par voie sous-cutanée à des souris femelles (panneaux supérieurs) ou mâles (panneaux inférieurs), âgées de 19 à 22 semaines, hétérozygotes (409/wt) ou homozygotes (409/409) pour la mutation D409V. Le volume tumoral a été déterminé aux jours indiqués (A et D). Les données sont exprimées en moyennes ± SEM des valeurs observées sur un effectif total de 6 à 9 souris et correspondant à 2 ou 3 expériences indépendantes. Simultanément, le poids des tumeurs (B et E) a été mesuré aux moments indiqués et est exprimé en pourcentage des valeurs observées chez les animaux hétérozygotes. Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM, de 3 à 8 souris par groupe. Le poids des rates a été déterminé chez les souris 409/409 ou 409/wt implantées avec les B16F10 et sacrifiées 20 jours après inoculation (C et F).

### 3.2.5. La croissance tumorale des cellules de mélanome est augmentée chez les souris Gaucher femelles (Null/409)

Après injection par voie sous-cutanée de cellules de mélanome B16F10 ($3x10^5$), le volume tumoral est significativement augmenté chez les souris femelles hétérozygotes composites (Null/409) par rapport à des souris sauvages de triple fond génétique (Fig. 10, A). Le poids des tumeurs est lui aussi supérieur (de 210 à 490%) chez les souris Gaucher femelles (Fig. 10, B). Chez ces animaux, le poids de la rate est inchangé par rapport aux souris contrôles (Fig. 10, C).

### 3.2.6. La croissance tumorale des cellules de mélanome est accrue chez les souris Gaucher mâles (Null/409)

Même si la différence n'atteint pas la significativité, le volume (Fig. 10, D) ainsi que le poids (Fig. 10, E) des tumeurs sous-cutanées formées par les cellules B16F10 sont plus importants chez les souris Gaucher mâles (Null/409) que chez des souris mâles témoins. Le poids de la rate n'est pas significativement plus grand chez les souris Gaucher mâles (Fig. 10, F).

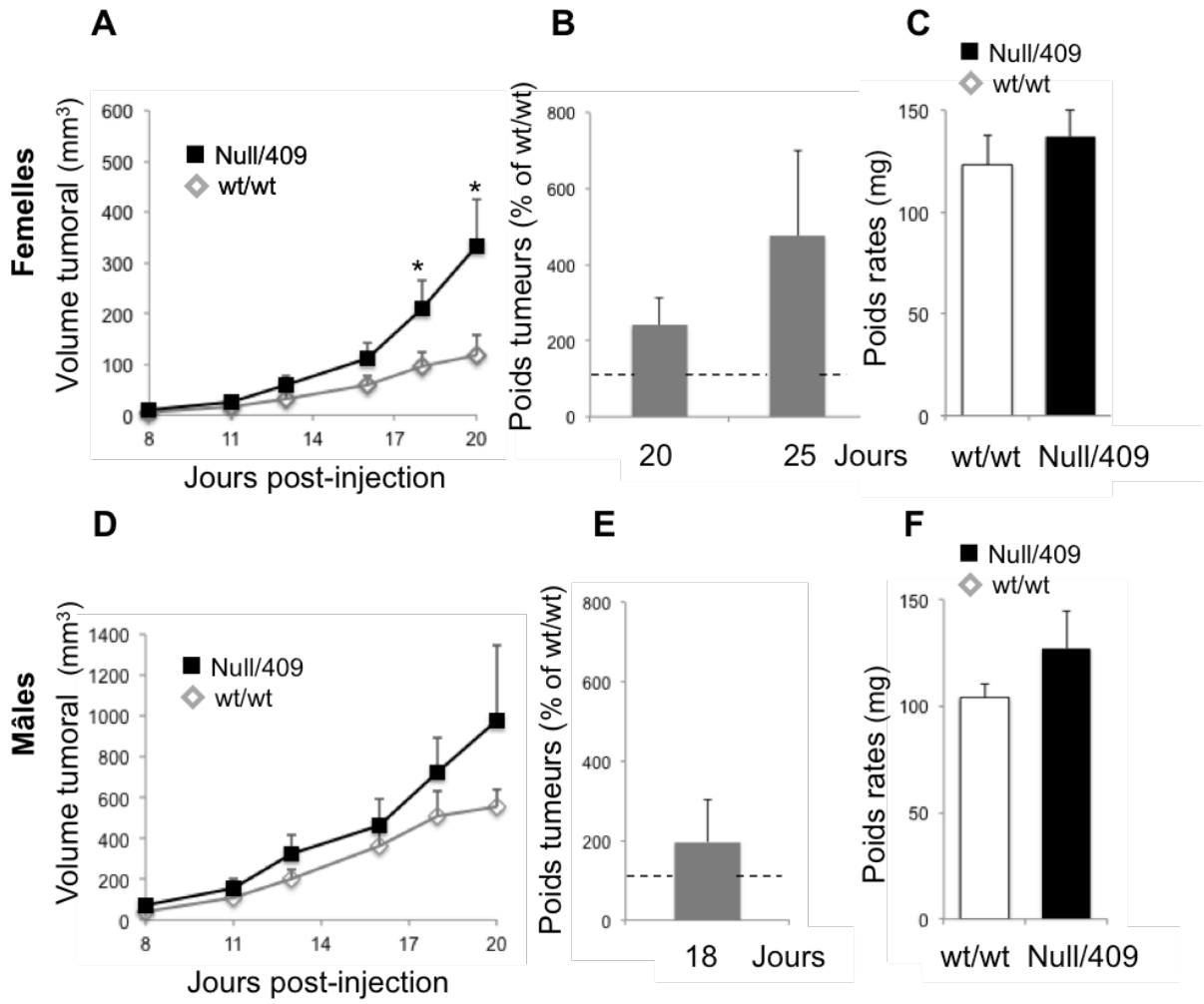


**Figure 10 : Croissance des tumeurs de mélanome chez des souris Gaucher (triple fond génétique C57/129/FVB)**. Des cellules B16F10 ($3X10^5$) ont été implantées en sous-cutané à des souris femelles (panneaux du haut) et à des souris mâles (panneaux du bas), âgées de 19-22 semaines, wild-type (wt/wt) et hétérozygotes composites D409V/null (Null/409). Le volume tumoral a été déterminé aux jours indiqués (A et D). Les résultats sont donnés en moyennes ± SEM des valeurs mesurées chez un total de 7 à 21 souris correspondant à 2 à 4 expériences indépendantes. Simultanément, les poids des tumeurs (B et E) étaient mesurés aux temps indiqués et sont exprimés en pourcentage des valeurs observées chez les souris contrôles. Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM, de 3 à 8 souris par groupe. Le poids des rates chez les souris 409/null ou wt/wt implantées avec les B16F10 a été aussi mesuré (C et F).

### 3.2.7. La proportion de cellules iNKT n'est pas altérée dans le modèle de souris Gaucher (409/409)

Les cellules NKT invariables (iNKT) participent à l'immunité anti-cancéreuse. Les iNKT sont un sous-groupe de lymphocytes T αβ, ayant une chaîne alpha du TCR invariable, qui reconnaît les lipides antigéniques liés à la molécule CD1d non polymorphique. Plusieurs glycosphingolipides naturels (α-GalCer, iGb3) sont des antigènes potentiels pour les iNKT. Le GlcCer endogène fournit aussi un signal majeur au TCR des iNKT. De plus, les molécules de CD1d avec lesquelles les iNKT interagissent, sont dérégulées dans la MG. Les iNKT sont également diminués dans divers modèles murins de maladies lysosomales. Dans la MG humaine, les iKNT sont en nombre normal mais les cellules NKT de type II dirigées contre le GlcCer C22:0 et la GlcSph ont un phénotype mémoire ainsi que T follicular helper, évoquant leur activation chronique. Dans ce contexte, nous avons donc souhaité analyser ces populations cellulaires chez nos animaux.

Le foie, la rate et le thymus de souris Gaucher (409/409) ont été analysés par cytométrie en flux pour quantifier les cellules iNKT. Pour cela, nous avons procédé à un marquage de cette population cellulaire par un anti-CD3 et le tétramère α-GalCer/CD1d. La Figure 11 montre que dans le modèle de souris Gaucher (409/409), les cellules iNKT représentent environ 2% des cellules T dans le thymus et dans la rate et 19 % dans le foie. Chez les souris contrôles (wt/wt), des valeurs comparables sont observées: environ 2% dans le thymus et la rate et 23% dans le foie. L'analyse des cellules CD3, CD4 et CD8 dans le foie, la rate et le thymus des souris Gaucher ne montre pas non plus de différences significatives par rapport aux souris contrôles (Fig. 12).

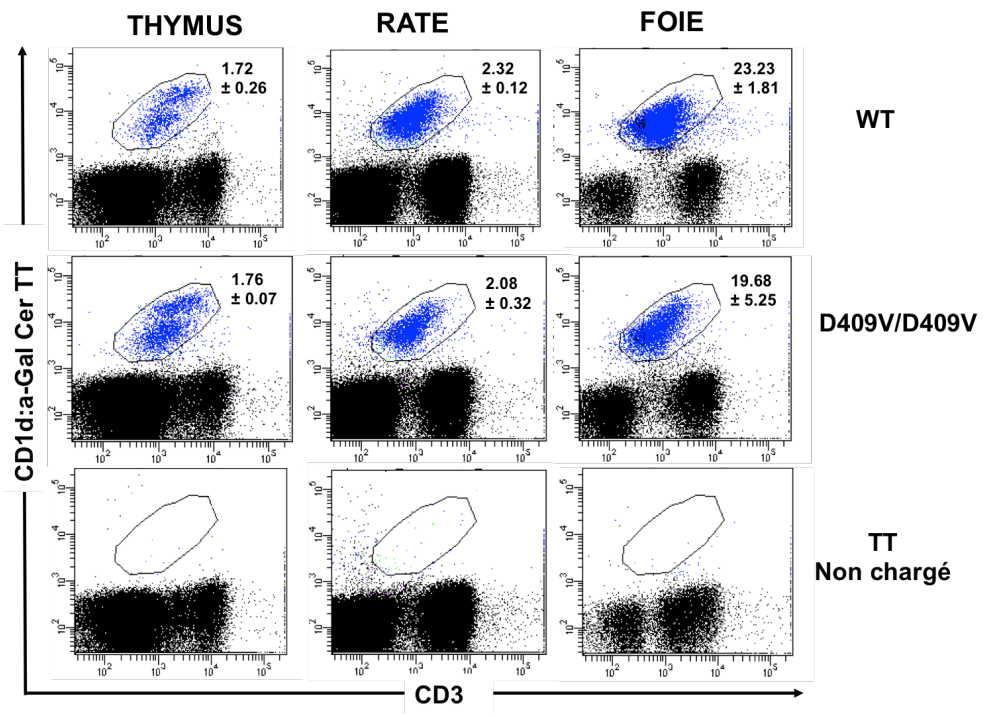


**Figure 11 : Analyse de la proportion de lymphocytes NKT dans les souris WT et Gaucher.** Les thymocytes, splénocytes et cellules mononucléées hépatiques des souris Gaucher sauvages ou 409/409 ont été marqués avec le tétramère (TT) CD1d chargé avec de l'α-GalCer ou non chargé, puis par un anti-CD3. Sur les figures, les populations de cellules entourées représentent les lymphocytes NKT. Les valeurs indiquées correspondent aux moyennes +/- SEM (4 à 5 souris par groupe).

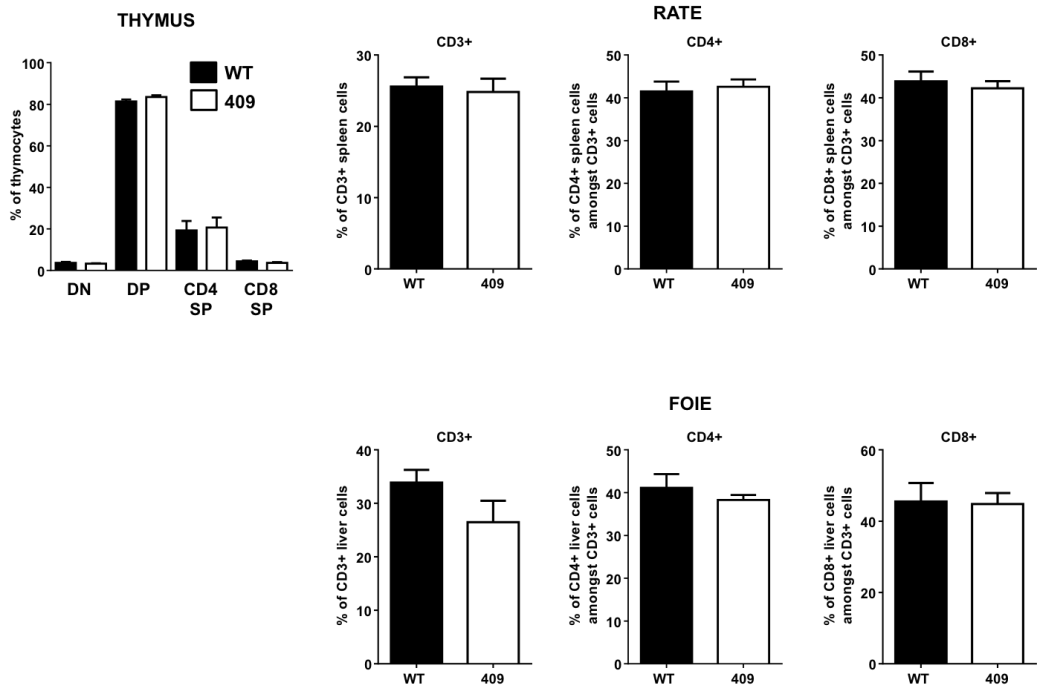


**Figure 12 : Analyse de la proportion de lymphocytes T dans les organes des souris Gaucher.** Les thymocytes, splénocytes et cellules mononucléées hépatiques des souris Gaucher 409/409 ont été marqués par un mélange d'anticorps anti-CD3, anti-CD4 et anti-CD8. Les valeurs indiquées correspondent aux moyennes +/- SEM (4 à 5 souris par groupe). DN : cellules double négatif ; DP : double positifs ; SP : simple positif.

### 3.2.8. Caractérisation des lymphocytes infiltrant les tumeurs chez les souris Gaucher (409/409)

Nous avons également analysé les cellules infiltrant la tumeur (TIL), 14 jours après l'implantation par voie sous-cutanée de cellules de mélanome B16F10 ($3x10^5$). Comme l'illustre la Figure 13, cette analyse ne montre pas de différences pour les lymphocytes T ou B, ni pour les cellules NK

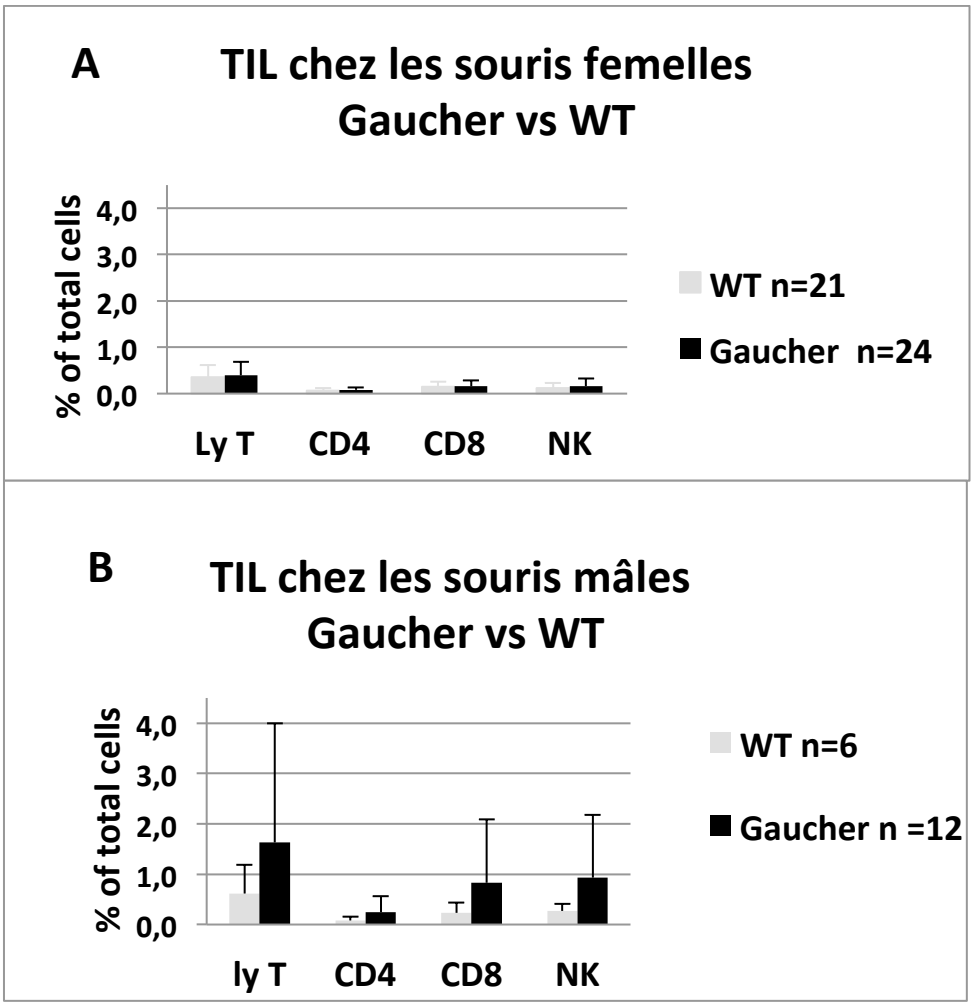


**Figure 13 : Analyse de la proportion de lymphocytes infiltrant la tumeur chez des souris Gaucher.** Après digestion mécanique et enzymatique des tumeurs développées chez les animaux sauvages ou 409/409, au14 ème jour après inoculation, les différentes populations de TIL ont été analysées par cytométrie en flux**.** Les valeurs indiquées correspondent aux moyennes +/- SEM (le nombre de souris par groupe est indiqué sur chaque figure). Les résultats correspondent à l'ensemble des expériences de TIL réalisées ; A : chez les souris femelles ; B : chez les souris mâles.

# 4 Discussion

Il existe actuellement des données convaincantes sur la surreprésentation des cancers dans la maladie de Gaucher. Cependant, les mécanismes impliqués demeurent mal compris. Deux hypothèses, qui ne sont pas mutuellement exclusives, peuvent être discutées (cf. paragraphe 6.2 de la revue générale):

- Une première possibilité est de considérer que la cancérogenèse serait en rapport avec l'accumulation de substrats comme le GlcCer (ou la GlcSph) ou, à l'inverse, une diminution du céramide, dans la future cellule maligne elle-même, conduisant à un déséquilibre de la balance anti et pro-proliférative, redirigée alors en faveur de la prolifération.
- Selon une seconde hypothèse, ce serait le microenvironnement Gaucher qui faciliterait l'émergence de pathologies malignes, où pourraient être impliquées des cellules du système immunitaire comme les lymphocytes T CD8, les lymphocytes T régulateurs CD4, les cellules NK, les cellules NKT, les TAM (tumor-associated macrophages), les cellules dendritiques, les MDSC (myeloid-derived suppressor cells) ou les cellules vasculaires.

1. La survenue de pathologies malignes serait en relation avec un déséquilibre du métabolisme des sphingolipides dans la (future) cellule cancéreuse.

La cancérogènese pourrait être en rapport avec l'accumulation de sphingolipides comme le GlcCer ou la diminution du céramide, résultant en une prolifération. Comme nous l'avons vu, le GlcCer pourrait favoriser la prolifération, ou diminuer la chimiosensibilité. De plus, le déficit en GBA1 pourrait diminuer la formation du céramide à partir du GlcCer et/ou favoriser la sécrétion d'IL6 de certaines cellules cancéreuses en réponse à certaines molécules (PMA ou TNF).

Nous avons donc créé un modèle cellulaire de mélanome ayant un déficit en GBA1 en utilisant un ShRNA dirigé contre GBA1. Nous avons ainsi pu obtenir des cellules de mélanome déficitaires en GCase. Nos résultats montrent que la viabilité cellulaire est augmentée en présence d'une faible quantité de sérum et pourrait être due à une diminution de la mort cellulaire induite par la privation en sérum. De plus, les modifications des sphéroïdes, correspondant à des modifications dans la croissance en trois dimensions, pourraient avoir un rôle soit sur la prolifération *in vivo* ou pourraient conduire à des modifications favorisant la survie ou encore l'accès ou la présentation antigénique aux cellules immunitaires. Ces résultats devraient être complétés par l'analyse des sphingolipides (GlcCer et GlcSph) par spectrométrie de masse, un dosage des chimiokines et cytokines sécrétées par ces cellules. De

plus, il serait souhaitable idéalement d'obtenir des clones où l'inhibition de la GCase est encore plus marquée. Ces observations doivent être reproduites dans d'autres lignées de mélanome, idéalement murines pour pouvoir réaliser des injections à des souris, et suivre le développement de ces lignées déficitaires en GBA1 dans des souris immunocompétentes.

Dans la cellule tumorale, le déficit en GCase résulterait en une augmentation du GlcCer et/ou une diminution du céramide, pouvant conduire à un déséquilibre en faveur de la prolifération. En effet, le déficit en GlcCase doit diminuer la formation de céramide, céramide, qui est capable d'induire l'apoptose de nombreuses cellules cancéreuses dont le mélanome (355). Dans la cellule cancéreuse, le déficit enzymatique conduit également à une accumulation de GlcCer. Dans la littérature, le GlcCer est retrouvé augmenté dans des lignées résistantes ; peut entraîner une prolifération de l'épiderme murin ; peut favoriser la prolifération de certaines lignées cellulaires ; et est également augmenté dans certaines maladies génétiques humaines ou murines responsables d'une prolifération épithéliale rénale créant des kystes (polykystose rénale) (334). Le déficit en GBA1 peut favoriser la chimiorésistance dans certaines lignées cellulaires et favoriser la survie en modulant Akt, la voie PI3K-Akt étant une voie de survie cellulaire importante dans le mélanome (337). En effet, un siRNA contre la GBA1 prévient la décroissance d'Akt phosphorylée induite par une chimiothérapie, favorisant ainsi la survie cellulaire. Le GlcCer peut également favoriser la sécrétion d'IL6 dans certaines lignées cellulaires dans certaines circonstances. Le déficit en GBA1 pourrait également diminuer le céramide provenant de la voie de sauvetage de la sphingosine, et diminuer l'apoptose produite par certaines chimiothérapies (339).
Concernant la chimiosensibilité, dans nos recherches préliminaires, nous avions recherché à savoir si des lignées de myélome multiple (lignées NCI-H929 et RPMI 8226) dans lesquelles nous avons pharmacologiquement inhibé la GCase par du CBE à 100 ou 200 μM modifiaient leur sensibilité à des chimiothérapies. Nous n'avons cependant pas pu mettre en évidence de différence significative.

La glucosylsphingosine pourrait également avoir une action sur les cellules cancéreuses. La GlcSph est la forme déacylée du GlcCer et est aussi retrouvée dans les tissus de patients Gaucher. Plus récemment, il a été montré que la GlcSph plasmatique était bien corrélée aux autres marqueurs d'activité et à la réponse à l'enzymothérapie, et qu'elle pourrait être responsable de la déminéralisation osseuse, ainsi que des troubles neurologiques. Elle a été décrite comme pouvant être cytotoxique, produire de l'hémolyse, et également inhiber la PKC

(236). Ainsi, pour préciser, le rôle exact de la GlcSph dans les effets observés dans les cellules de mélanome humain A375, il faudrait tester l'ajout de faibles quantités de GlcSph sur les cellules de mélanome en culture, et analyser leur comportement en terme de prolifération, migration, sécrétion de cytokines ou de facteurs de croissance.

2. L'émergence de cancers dans la maladie de Gaucher est liée à un microenvironnement favorable. Nos résultats montrent que dans deux modèles murins différents de MG de type 1, la croissance tumorale des cellules de mélanome, inoculées par voie sous-cutanée, est augmentée comparée aux contrôles, tant chez les animaux femelles que chez les mâles. Il s'agit du premier modèle murin de développement du mélanome dans la MG. Nous montrons également le même type de résultats avec un autre type de cellules de mélanome (les B16BL6) implantées par une autre voie, la voie intra-dermique (donc, en orthotopique) à des souris Gaucher (409/409) (Fig. 14).

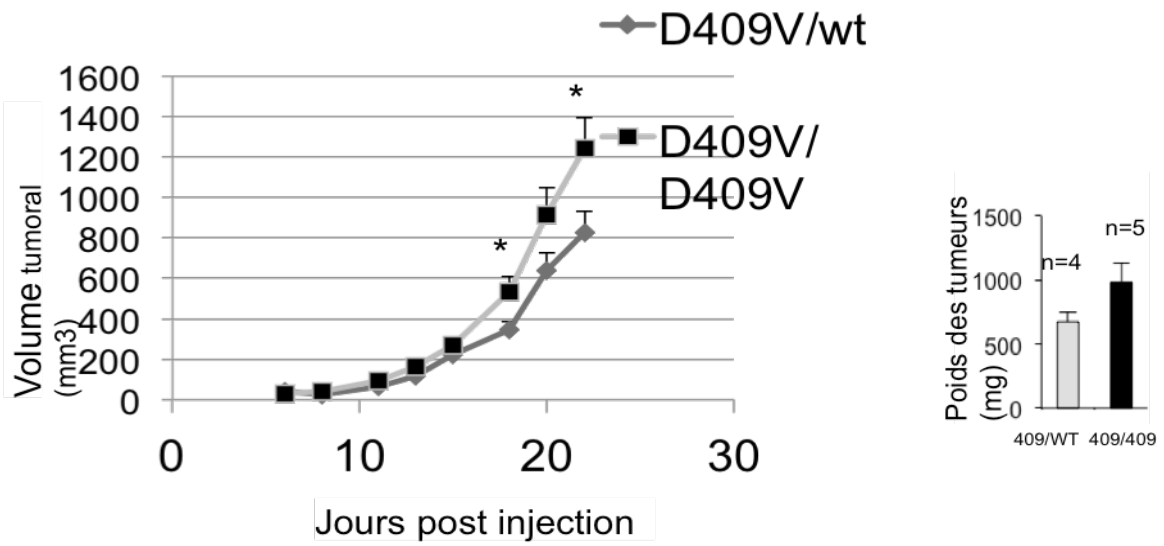


**Figure 14 : Croissance tumorale de B16BL6 en intra-dermique dans des souris femelles Gaucher :** 500000 cellules de B16BL6 sont injectées par voie intra-dermique chez les souris D409V/D409V et des souris D409V/wt (contrôles) âgées de 19 à 22 semaines. Le volume tumoral est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse jusqu'à la date de sacrifice où le poids de la tumeur a été déterminé.

Nos résultats montrent tout d'abord que nos souris Gaucher développent bien un phénotype classique Gaucher de type 1. Les souris ne présentent pas de splénomégalie, d'hépatomégalie ou de signes neurologiques, et leur longévité n'est pas diminuée (environ 2 ans). Les cellules de Gaucher dans les D409V/null apparaissent à 3-4 mois tandis que dans les souris D409V/D409V, elles apparaissent après 7 mois, et sont retrouvées dans la rate et faiblement dans le foie (195). Il n'est pas retrouvé de cellules de surcharge dans la moelle osseuse, les

reins ou le cerveau. L'accumulation de GlcCer s'observe dans ces souris dans le foie, la rate et les poumons mais pas dans le cerveau (195).

Les souris que nous avons obtenues dans nos animaleries présentent, comme attendu, une diminution de l'activité enzymatique, que ce soit chez les souris double fond D409V/D409V où l'activité enzymatique est diminuée au 1/5$^{e}$ de l'activité des souris hétérozygotes dans le foie et 1/10$^{e}$ dans la rate, mais également dans le modèle triple fond D409V/null où l'activité GCase est diminuée au 1/25$^{e}$ de l'activité des souris sauvages dans le foie et également au 1/10$^{e}$ dans la rate. Ces activités enzymatiques résiduelles sont plus élevées que celles rapportées par Xu *et al.* où l'activité était d'environ 3-4% dans le foie et autour de 6% dans la rate dans les deux modèles de souris (195).

En ce qui concerne la surcharge en sphingolipides chez ces animaux mutants, nous retrouvons dans les souris D409V/D409V, par rapport aux souris hétérozygotes, une augmentation du GlcCer de 1,5 fois et de la GlcSph de 5 fois. Ces résultats concordent avec ceux de Xu *et al.*, où le GlcCer est augmenté de 2 fois par rapport aux souris wt/wt. Le modèle D409V/null accumule plus de GlcCer (x4) que le modèle D409V/D409V dans les résultats de Xu *et al.*. Nous n'avons pas pu évaluer l'augmentation du GlcCer précisément (par LC-MS) dans nos souris D409V/null, mais le taux observé en chromatographie sur couche mince semble correspondre aux mêmes résultats. La surcharge en GlcCer apparaît dans ce modèle progressivement avec l'âge des souris et les souris Gaucher et les souris contrôles ont été testées dans nos expériences au même âge.

En ce qui concerne la GlcSph, dans les travaux de l'équipe de Grabowski, la GlcSph est retrouvée augmentée dans tous les tissus (principalement le poumon mais également le foie et la rate) dans les souris D409V/null mais uniquement dans la rate et un peu dans le foie dans les souris D409V/D409V (356).

Les deux modèles de souris Gaucher que nous avons analysés révèlent, pour les deux sexes, une augmentation de la croissance tumorale par rapport aux animaux hétérozygotes ou sauvages. Avant d'analyser les mécanismes impliqués possiblement en lien avec la MG, on peut se demander si les différences observées entre les groupes d'animaux sont en rapport avec leur fond génétique. Nous avons utilisé des souris ayant un double ou même triple fond, dont au moins le fond génétique C57BL/6, qui est celui des cellules implantées (B16F10). Cependant, au cours de l'élevage, le pourcentage exact dans le modèle de double ou triple fond, ne peut être garanti et la comparaison exacte des fonds génétiques de souris Gaucher et des animaux contrôles n'a pas été réalisée. Afin de tester l'influence possible de variations

dans le fond génétique des souris, nous avions l'intention de traiter les souris Gaucher par enzymothérapie substitutive (ERT) ou réduction de substrat (SRT). Si l'effet sur la croissance tumorale était aboli après une douzaine de semaines de traitement par GCase recombinante ou par eliglustat (traitements débutés vers la 6ème ou 8ème semaine de vie des souris Gaucher), il serait possible d'écarter l'influence du fond génétique et démontrer que la croissance tumorale accrue est bien liée à l'environnement Gaucher. Néanmoins, il se peut que ce(s) traitement(s), même bien mené(s), ne corrige(nt) pas les cellules directement impliquées dans le développement du mélanome.

Nous avons exploré les mécanismes immunologiques possiblement impliqués dans la différence de croissance du mélanome. Les iNKT, capables de reconnaître des antigènes lipidiques se liant à une molécule CD1d, participent à l'immunosurveillance anti-tumorale. Dans différents modèles murins de maladies lysosomales (maladies de Sandhoff, Fabry, gangliosidose à GM1, maladie de Tay-Sachs à début tardif, et maladie de Niemann-Pick type C1), les iNKT ont été retrouvées diminuées de 50 à 90% (357). C'est la première fois que les iNKT sont évaluées dans un modèle murin de MG. A l'aide d'un marquage avec un tétramère CD1d chargé avec l'αGalCer, nous n'avons pas noté de différence, que ce soit dans le foie, la rate ou le thymus des souris Gaucher par rapport aux souris contrôles. De plus, les pourcentages de cellules CD3, CD4, CD8 ou de cellules NK ne sont pas significativement différents chez des souris naïves Gaucher par rapport au groupe témoin.
Nous avons ensuite investigué les TILs (lymphocytes infiltrant la tumeur) dans des tumeurs de mélanome, 14 jours après injection en sous-cutané chez des souris Gaucher. Nous n'avons pas trouvé de différences significatives dans la proportion de lymphocytes T CD4+, CD8+, de lymphocytes NK dans les souris Gaucher (409/409) et les souris contrôles.
Cette absence de différence pourrait être due au fond génétique mixte de ces souris qui aurait pu évoluer après plusieurs croisements. Ce problème a possiblement entraîné une hétérogénéité du poids des tumeurs dans le groupe Gaucher et le groupe contrôle, ne permettant pas d'objectiver des différences dans les TILs. De plus, le moment de l'évaluation des TILs peut également avoir conduit à des biais. En effet, nous avons analysé les TILs 14 jours après l'implantation en sous-cutané, à un moment peut-être trop précoce ou trop tardif pour observer des différences. Nous avons également comparé les TILs dans les grosses tumeurs et dans les petites tumeurs, sans qu'il soit retrouvé de différence significative.
Il aurait été souhaitable de caractériser plus finement les différentes populations immunitaires en examinant d'autres populations comme les lymphocytes B et les NKT de type II, les

marqueurs d'activation et le profil de production de cytokines. En effet, les cytokines pourraient également être impliquées, puisque dans le même modèle murin de MG (D409V/null), diverses cytokines sériques, telles que IFNγ, IL12p40, TNFα, IL17A/F, IL6, TGFβ, sont augmentées tandis que l'IL4 reste normale (326). De plus, dans ce modèle, les cellules mononucléées du foie, de la rate et du poumon stimulées par CD3/CD28 augmente les cytokines Th1 et Th17 (326). Les cytokines Th17 sont impliquées dans l'inflammation et pourraient également favoriser le cancer mais cela reste encore controversé.
De même, l'évaluation des tumor-associated macrophages (TAM) et des myeloid-derived suppressor cells (MDSC) dans les TILs aurait pu également permettre d'expliquer les différences observées. En effet, les MDSC sont impliquées dans le microenvironnement du mélanome et favorise la progression tumorale en produisant une diminution importante des réponses immunitaires anti-tumorales (358). Les MDSC semblent également impliqués dans la cancérogénèse du myélome (359).

De nombreuses dysfonctions du système immunitaire de la MG pourraient favoriser le cancer. Chez les patients Gaucher comme dans les souris Gaucher, les taux plasmatiques de certaines cytokines et chimiokines sont élevés. Les patients Gaucher montrent une réponse anormale des lymphocytes T, une diminution de cellules (NK), une augmentation importante des T CD4+ mémoire et une diminution des cellules dendritiques myéloïdes et plasmocytoïdes. Les NKT dirigées contre la GlcSph étaient augmentées chez les patients Gaucher comparativement aux témoins tandis que les NKT de type I n'étaient pas affectées. De plus, les molécules de CD1d sont également dérégulées (up-régulation) dans la MG.
Les cellules Gaucher affichent un phénotype de macrophages alternativement activés, correspondant à des macrophages de type II, qui pourraient favoriser le développement des cancers (251). Elles seraient à l'origine de la sécrétion de cytokines, produisant une stimulation chronique des lymphocytes B responsable des gammapathies polyclonales, qui évolueront en gammapathie monoclonale et enfin en myélome.
La cellule stromale mésenchymateuse (MSC) dans la MG est également dérégulée et sécrète de nombreuses cytokines et chimiokines (70). Elle pourrait faciliter le développement tumoral.
Les modèles animaux de MG présentent également une dysfonction du système immunitaire, avec dans certains modèles une inflammation chronique, avec dans d'autres modèles, une infiltration avec des macrophages et des cellules dendritiques dans divers organes, avec des

cytokines et chimiokines augmentées. Dans un autre modèle, on observe aussi une maturation et une différenciation anormales des lymphocytes T (203).
D'après nos résultats, c'est plus le microenvironnement de la maladie de Gaucher qui favoriserait la croissance tumorale, et probablement plus par des mécanismes cytokiniques que par les cellules immunitaires impliquées. Le microenvironnement Gaucher est en rapport avec la surcharge en sphingolipides et en particuliers en GlcCer et/ou GlcSph cependant dans le modèle des lymphomes de Cox *et al*., les souris Gaucher développant des lymphomes sont celles qui ont moins de surcharge en GlcCer et GlcSph (330). Dans ce modèle, le traitement visant à corriger la surcharge conduit à une diminution des lymphomes. De plus, dans une autre étude, des souris Gaucher avec gammapathie, la diminution de la surcharge par l'utilisation de réduction de substrat (eliglustat) montre également une diminution du composant monoclonal (331).

Une autre possibilité, non analysée ici, est que la différence observée dans le volume des tumeurs pourrait être en rapport avec une différence dans l'angiogenèse favorisant la croissance tumorale. Il aurait fallu caractériser la vascularisation des tumeurs, par exemple, par un marquage avec un anti-CD31. Il n'existe pas de données sur le GlcCer et l'angiogénèse. Cependant, une étude montre que le vascular endothelial growth factor (VEGF) utilise le lactosylcéramide comme second messager pour favoriser l'angiogénèse (360). Le lactosylcéramide peut provenir du GlcCer par la lactosylcéramide synthase. L'augmentation du GlcCer dans la MG pourrait ainsi augmenter le LacCer et favoriser l'angiogénèse dans nos modèles.
Dans le cadre du microenvironnement du mélanome, on pourrait évoquer également la composante fibroblastique du stroma tumoral. Le fibroblaste associé au cancer peut favoriser le développement du mélanome (361). Afin de mieux préciser son implication, on pourrait évaluer *in vitro* des fibroblastes murin Gaucher en co-culture avec des cellules de mélanome et *in vivo* en implantant des fibroblastes Gaucher et non Gaucher avec des cellules de mélanome dans des souris immunocompétentes.

Certains auteurs ont également postulé que c'est l'enzymothérapie qui serait responsable de la survenue de cancers dans la maladie de Gaucher mais les données épidémiologiques montrent que l'incidence n'a pas changé entre la période avant et après l'enzymothérapie.

Une autre hypothèse est également formulée en rapport avec l'hyperferritinémie observée dans la maladie de Gaucher. L'hyperferritinémie serait liée à la sécrétion d'IL6 qui augmenterait l'hepcidine, favorisant la séquestration du fer dans les macrophages. Les cellules de Gaucher favoriseraient ensuite le transport de fer en dehors des macrophages, et cette surcharge ferrique serait toxique et favoriserait le cancer. Ces éléments pourraient cependant expliquer pourquoi, il existe également sur le plan épidémiologique, une augmentation importante du risque de développer des carcinomes hépatocellulaires dans la MG (362).

# CONCLUSION GÉNÉRALE

La maladie de Gaucher est la maladie lysosomale la plus fréquente. L'enzymothérapie substitutive en a nettement modifié l'évolution. Les patients atteints de certaines de ces maladies métaboliques, parfois sévères et s'exprimant dès l'enfance, n'arrivaient pas à l'âge adulte. Ces maladies s'améliorant à l'aide de nouvelles thérapeutiques, ce sont les complications à l'âge adulte et à long terme qui deviendront le principal problème médical posé chez ces patients.

Dans la MG de type 1, il est maintenant clairement établi que le risque relatif de développer des cancers, et de tous types, est élevé. Comprendre les mécanismes physiopathologiques conduisant à cette augmentation pourrait permettre de développer des mesures visant à prévenir (ou retarder) leur apparition. Cela pourrait éventuellement aussi fournir des éléments de compréhension sur la physiopathologie des cancers en général. A l'instar de l'apport de la physiopathologie de la maladie de Parkinson dans la MG, dans la compréhension de cette maladie neurodégénérative en général et dans son traitement, la recherche sur le pourquoi d'une plus grande susceptibilité aux cancers au cours de la MG pourrait permettre également d'imaginer d'autres approches dans la prise en charge thérapeutique des cancers, par exemple en manipulant le métabolisme des sphingolipides.

Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons développé un modèle de croissance tumorale dans la MG, chez la souris, en utilisant deux types de modèles de souris Gaucher chez lesquelles nous avons implanté des cellules de mélanome. Nous avons d'abord confirmé que ces animaux développaient bien un phénotype Gaucher, caractérisé par le déficit enzymatique de la GCase et une surcharge en sphingolipides, tant du GlcCer que de la GlcSph. Nous avons observé dans ces deux modèles une augmentation de la croissance tumorale des cellules de mélanome comparée à celle dans les souris contrôles. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de modifications des cellules immunitaires (CD3, CD4, CD8 ou NK). Il n'a pas été retrouvé non plus de diminution des cellules NKT à l'inverse d'autres modèles murins de maladies lysosomales, qui aurait pu participer à la diminution de l'immunité anti-tumorale.

De plus, sur le plan cellulaire, en rendant des cellules de mélanome défectueuses en GCase pour mimer l'état Gaucher, grâce à l'utilisation de shRNA dirigé contre le gène GBA1, nous avons observé une viabilité augmentée en présence de faibles concentrations de sérum ainsi que des modifications dans leur croissance en trois dimensions qui pourraient avoir une implication dans les observations faites *in vivo*. Chez l'Homme (le patient Gaucher), la cellule cancéreuse et l'environnement Gaucher agissent de concert.

Ces modèles murins de croissance tumorale semblent être de bons modèles pour l'étude de la cancérogenèse dans la MG, et tenter de disséquer les mécanismes impliqués; ils pourraient aussi s'appliquer à d'autres pathologies prolifératives.

Parmi les perspectives de ce travail, citons la possibilité d'implanter des cellules de myélome, hémopathie qui est la plus fréquente dans la MG dans les souris Gaucher, mais les myélomes murins sont souvent issus de souris BALB et non pas de C57BL/6.
On pourrait également croiser une souris modèle de myélome (avec dysrégulation de c-Myc par exemple) avec les souris Gaucher pour étudier la prolifération myélomateuse. Il serait également souhaitable de réaliser les mêmes expériences que nous avons réalisées avec des cellules de mélanome, mais rendues Gaucher, et implantées dans une souris Gaucher.
Afin de mieux comprendre le rôle du microenvironnement Gaucher, on pourrait imaginer utiliser des souriceaux wt/wt nouveau-nés et transplantés par des cellules souches hématopoïétiques provenant soit de souris sauvages, soit de souris Gaucher, puis inoculées vers 10-12 semaines par des cellules de mélanome. Cela permettrait d'évaluer au moins le rôle précis de la composante hématopoïétique. Une autre modalité d'expérience consisterait à utiliser un modèle murin de mélanome (mutations Braf et PTEN par exemple, où des mélanomes se développent spontanément avec l'âge) à qui on grefferait, comme ci-dessus, la moelle de souris sauvages ou Gaucher.

Après de nombreux travaux sur l'épidémiologie du cancer dans la maladie de Gaucher, il reste encore tout à découvrir sur la cancérogénèse dans la maladie de Gaucher et de nombreuses voies de recherche à explorer sur le plan cellulaire et aussi à l'aide des modèles animaux actuellement disponibles.

**Références**

1. Thudichum JLW. A Treatise on the Chemical Constitution of the Brain. 1884:p149.
2. Futerman AH, Hannun YA. The complex life of simple sphingolipids. EMBO Rep. 2004 Aug;5(8):777-82.
3. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Feb;9(2):139-50.
4. Morad SA, Cabot MC. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. Nat Rev Cancer. 2013 Jan;13(1):51-65.
5. Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. Nat Rev Cancer. 2004 Aug;4(8):604-16.
6. Ponnusamy S, Meyers-Needham M, Senkal CE, Saddoughi SA, Sentelle D, Selvam SP, et al. Sphingolipids and cancer: ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance. Future Oncol. 2010 Oct;6(10):1603-24.
7. Hanada K, Kumagai K, Tomishige N, Yamaji T. CERT-mediated trafficking of ceramide. Biochim Biophys Acta. 2009 Jul;1791(7):684-91.
8. Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M, et al. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. Nature. 2003 Dec 18;426(6968):803-9.
9. Weiss B, Stoffel W. Human and murine serine-palmitoyl-CoA transferase--cloning, expression and characterization of the key enzyme in sphingolipid synthesis. Eur J Biochem. 1997 Oct 1;249(1):239-47.
10. Hanada K, Hara T, Nishijima M, Kuge O, Dickson RC, Nagiec MM. A mammalian homolog of the yeast LCB1 encodes a component of serine palmitoyltransferase, the enzyme catalyzing the first step in sphingolipid synthesis. J Biol Chem. 1997 Dec 19;272(51):32108-14.
11. Williams RD, Wang E, Merrill AH, Jr. Enzymology of long-chain base synthesis by liver: characterization of serine palmitoyltransferase in rat liver microsomes. Arch Biochem Biophys. 1984 Jan;228(1):282-91.
12. Merrill AH, Jr., Wang E, Stevens J, Brumley GW. Activities of the initial enzymes of glycerolipid and sphingolipid synthesis in lung microsomes from rats exposed to air or 85% oxygen. Biochem Biophys Res Commun. 1984 Mar 30;119(3):995-1000.
13. Eliot AC, Kirsch JF. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. Annu Rev Biochem. 2004;73:383-415.
14. Yard BA, Carter LG, Johnson KA, Overton IM, Dorward M, Liu H, et al. The structure of serine palmitoyltransferase; gateway to sphingolipid biosynthesis. J Mol Biol. 2007 Jul 27;370(5):870-86.
15. Hornemann T, Wei Y, von Eckardstein A. Is the mammalian serine palmitoyltransferase a high-molecular-mass complex? Biochem J. 2007 Jul 1;405(1):157-64.
16. Mandon EC, Ehses I, Rother J, van Echten G, Sandhoff K. Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. J Biol Chem. 1992 Jun 5;267(16):11144-8.
17. Yasuda S, Nishijima M, Hanada K. Localization, topology, and function of the LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase in mammalian cells. J Biol Chem. 2003 Feb 7;278(6):4176-83.
18. Han G, Gupta SD, Gable K, Niranjanakumari S, Moitra P, Eichler F, et al. Identification of small subunits of mammalian serine palmitoyltransferase that confer distinct acyl-CoA substrate specificities. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 May 19;106(20):8186-91.
19. Siow D, Sunkara M, Morris A, Wattenberg B. Regulation of de novo sphingolipid biosynthesis by the ORMDL proteins and sphingosine kinase-1. Adv Biol Regul. 2015 Jan;57:42-54.

20. Penno A, Reilly MM, Houlden H, Laura M, Rentsch K, Niederkofler V, et al. Hereditary sensory neuropathy type 1 is caused by the accumulation of two neurotoxic sphingolipids. J Biol Chem. 2010 Apr 9;285(15):11178-87.
21. Eichler FS, Hornemann T, McCampbell A, Kuljis D, Penno A, Vardeh D, et al. Overexpression of the wild-type SPT1 subunit lowers desoxysphingolipid levels and rescues the phenotype of HSAN1. J Neurosci. 2009 Nov 18;29(46):14646-51.
22. Gable K, Gupta SD, Han G, Niranjanakumari S, Harmon JM, Dunn TM. A disease-causing mutation in the active site of serine palmitoyltransferase causes catalytic promiscuity. J Biol Chem. 2010 Jul 23;285(30):22846-52.
23. Xue HH, Fujie M, Sakaguchi T, Oda T, Ogawa H, Kneer NM, et al. Flux of the L-serine metabolism in rat liver. The predominant contribution of serine dehydratase. J Biol Chem. 1999 Jun 4;274(23):16020-7.
24. Hanada K, Hara T, Nishijima M. Purification of the serine palmitoyltransferase complex responsible for sphingoid base synthesis by using affinity peptide chromatography techniques. J Biol Chem. 2000 Mar 24;275(12):8409-15.
25. Merrill AH, Jr., Nixon DW, Williams RD. Activities of serine palmitoyltransferase (3-ketosphinganine synthase) in microsomes from different rat tissues. J Lipid Res. 1985 May;26(5):617-22.
26. Kihara A, Igarashi Y. 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. 2004 Nov 19;279(47):49243-50.
27. Levy M, Futerman AH. Mammalian ceramide synthases. IUBMB Life. 2010 May;62(5):347-56.
28. Stiban J, Tidhar R, Futerman AH. Ceramide synthases: roles in cell physiology and signaling. Adv Exp Med Biol. 2010;688:60-71.
29. Maceyka M, Sankala H, Hait NC, Le Stunff H, Liu H, Toman R, et al. SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. J Biol Chem. 2005 Nov 4;280(44):37118-29.
30. Pitson SM. Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling. Trends Biochem Sci. 2011 Feb;36(2):97-107.
31. Sridevi P, Alexander H, Laviad EL, Min J, Mesika A, Hannink M, et al. Stress-induced ER to Golgi translocation of ceramide synthase 1 is dependent on proteasomal processing. Exp Cell Res. 2010 Jan 1;316(1):78-91.
32. Pettus BJ, Chalfant CE, Hannun YA. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. Biochim Biophys Acta. 2002 Dec 30;1585(2-3):114-25.
33. Gulbins E, Li PL. Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2006 Jan;290(1):R11-26.
34. Venable ME, Lee JY, Smyth MJ, Bielawska A, Obeid LM. Role of ceramide in cellular senescence. J Biol Chem. 1995 Dec 22;270(51):30701-8.
35. Espaillat M, Shamseddine AA, Adada MM, Hannun YA, Obeid LM. Ceramide and sphingosine-1-phosphate in cancer, two faces of the sphinx. Transl Cancer Res. 2015;4(5):484-99.
36. Degroote S, Wolthoorn J, van Meer G. The cell biology of glycosphingolipids. Semin Cell Dev Biol. 2004 Aug;15(4):375-87.
37. Karlsson KA. Sphingolipid long chain bases. Lipids. 1970 Nov;5(11):878-91.
38. Gault CR, Obeid LM, Hannun YA. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. Adv Exp Med Biol. 2010;688:1-23.
39. Lingwood CA. Glycosphingolipid functions. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Jul;3(7):a004788

40. Jennemann R, Grone HJ. Cell-specific in vivo functions of glycosphingolipids: Lessons from genetic deletions of enzymes involved in glycosphingolipid synthesis. Prog Lipid Res. 2013 Apr;52(2):231-48.
41. Yamashita T, Wada R, Sasaki T, Deng C, Bierfreund U, Sandhoff K, et al. A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Aug 3;96(16):9142-7.
42. Huitema K, van den Dikkenberg J, Brouwers JF, Holthuis JC. Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. Embo J. 2004 Jan 14;23(1):33-44.
43. Giussani P, Colleoni T, Brioschi L, Bassi R, Hanada K, Tettamanti G, et al. Ceramide traffic in C6 glioma cells: evidence for CERT-dependent and independent transport from ER to the Golgi apparatus. Biochim Biophys Acta. 2008 Jan-Feb;1781(1-2):40-51.
44. Basu S, Kaufman B, Roseman S. Enzymatic synthesis of ceramide-glucose and ceramide-lactose by glycosyltransferases from embryonic chicken brain. J Biol Chem. 1968 Nov 10;243(21):5802-4.
45. Ichikawa S, Sakiyama H, Suzuki G, Hidari KI, Hirabayashi Y. 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. 1996 May 14;93(10):4638-43.
46. Ichikawa S, Ozawa K, Hirabayashi Y. Assignment of a UDP-glucose:ceramide glucosyltransferase gene (UGCG) to human chromosome band 9q31 by in situ hybridization. Cytogenet Cell Genet. 1997;79(3-4):233-4.
47. Ichikawa S, Sakiyama H, Suzuki G, Hidari KI, Hirabayashi Y. 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. 1996 Oct 29;93(22):12654.
48. Marks DL, Wu K, Paul P, Kamisaka Y, Watanabe R, Pagano RE. Oligomerization and topology of the Golgi membrane protein glucosylceramide synthase. J Biol Chem. 1999 Jan 1;274(1):451-6.
49. D'Angelo G, Polishchuk E, Di Tullio G, Santoro M, Di Campli A, Godi A, et al. Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide. Nature. 2007 Sep 6;449(7158):62-7.
50. Halter D, Neumann S, van Dijk SM, Wolthoorn J, de Maziere AM, Vieira OV, et al. Pre- and post-Golgi translocation of glucosylceramide in glycosphingolipid synthesis. J Cell Biol. 2007 Oct 8;179(1):101-15.
51. Kolter T, Sandhoff K. Lysosomal degradation of membrane lipids. FEBS Lett. 2010 May 3;584(9):1700-12.
52. Brady RO, Kanfer J, Shapiro D. The Metabolism of Glucocerebrosides. I. Purification and Properties of a Glucocerebroside-Cleaving Enzyme from Spleen Tissue. J Biol Chem. 1965 Jan;240:39-43.
53. Grabowski GA, Gatt S, Horowitz M. Acid beta-glucosidase: enzymology and molecular biology of Gaucher disease. Crit Rev Biochem Mol Biol. 1990;25(6):385-414.
54. Henrissat B, Callebaut I, Fabrega S, Lehn P, Mornon JP, Davies G. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Jul 18;92(15):7090-4.
55. Akiyama H, Kobayashi S, Hirabayashi Y, Murakami-Murofushi K. Cholesterol glucosylation is catalyzed by transglucosylation reaction of beta-glucosidase 1. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Nov 29;441(4):838-43.
56. Grace ME, Grabowski GA. Human acid beta-glucosidase: glycosylation is required for catalytic activity. Biochem Biophys Res Commun. 1990 Apr 30;168(2):771-7.
57. Erickson AH, Ginns EI, Barranger JA. Biosynthesis of the lysosomal enzyme glucocerebrosidase. J Biol Chem. 1985 Nov 15;260(26):14319-24.

58. Barneveld RA, Keijzer W, Tegelaers FP, Ginns EI, Geurts van Kessel A, Brady RO, et al. Assignment of the gene coding for human beta-glucocerebrosidase to the region q21-q31 of chromosome 1 using monoclonal antibodies. Hum Genet. 1983;64(3):227-31.
59. Ginns EI, Choudary PV, Martin BM, Winfield S, Stubblefield B, Mayor J, et al. Isolation of cDNA clones for human beta-glucocerebrosidase using the lambda gt11 expression system. Biochem Biophys Res Commun. 1984 Sep 17;123(2):574-80.
60. Sorge J, West C, Westwood B, Beutler E. Molecular cloning and nucleotide sequence of human glucocerebrosidase cDNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Nov;82(21):7289-93.
61. Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, Sidransky E. Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). Hum Mutat. 2008 May;29(5):567-83.
62. Miao S, McCarter JD, Grace ME, Grabowski GA, Aebersold R, Withers SG. Identification of Glu340 as the active-site nucleophile in human glucocerebrosidase by use of electrospray tandem mass spectrometry. J Biol Chem. 1994 Apr 15;269(15):10975-8.
63. Dvir H, Harel M, McCarthy AA, Toker L, Silman I, Futerman AH, et al. X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. EMBO Rep. 2003 Jul;4(7):704-9.
64. Premkumar L, Sawkar AR, Boldin-Adamsky S, Toker L, Silman I, Kelly JW, et al. X-ray structure of human acid-beta-glucosidase covalently bound to conduritol-B-epoxide. Implications for Gaucher disease. J Biol Chem. 2005 Jun 24;280(25):23815-9.
65. Fabrega S, Durand P, Mornon JP, Lehn P. [The active site of human glucocerebrosidase: structural predictions and experimental validations]. J Soc Biol. 2002;196(2):151-60.
66. Fabrega S, Durand P, Codogno P, Bauvy C, Delomenie C, Henrissat B, et al. Human glucocerebrosidase: heterologous expression of active site mutants in murine null cells. Glycobiology. 2000 Nov;10(11):1217-24.
67. Brumshtein B, Greenblatt HM, Butters TD, Shaaltiel Y, Aviezer D, Silman I, et al. Crystal structures of complexes of N-butyl- and N-nonyl-deoxynojirimycin bound to acid beta-glucosidase: insights into the mechanism of chemical chaperone action in Gaucher disease. J Biol Chem. 2007 Sep 28;282(39):29052-8.
68. Withers SG, Umezawa K. Cyclophellitol: a naturally occurring mechanism-based inactivator of beta-glucosidases. Biochem Biophys Res Commun. 1991 May 31;177(1):532-7.
69. Grabowski GA, Osiecki-Newman K, Dinur T, Fabbro D, Legler G, Gatt S, et al. Human acid beta-glucosidase. Use of conduritol B epoxide derivatives to investigate the catalytically active normal and Gaucher disease enzymes. J Biol Chem. 1986 Jun 25;261(18):8263-9.
70. Campeau PM, Rafei M, Boivin MN, Sun Y, Grabowski GA, Galipeau J. Characterization of Gaucher disease bone marrow mesenchymal stromal cells reveals an altered inflammatory secretome. Blood. 2009 Oct 8;114(15):3181-90.
71. Hein LK, Meikle PJ, Hopwood JJ, Fuller M. Secondary sphingolipid accumulation in a macrophage model of Gaucher disease. Mol Genet Metab. 2007 Dec;92(4):336-45.
72. Delgado A, Casas J, Llebaria A, Abad JL, Fabrias G. Inhibitors of sphingolipid metabolism enzymes. Biochim Biophys Acta. 2006 Dec;1758(12):1957-77.
73. Berg-Fussman A, Grace ME, Ioannou Y, Grabowski GA. Human acid beta-glucosidase. N-glycosylation site occupancy and the effect of glycosylation on enzymatic activity. J Biol Chem. 1993 Jul 15;268(20):14861-6.
74. Braulke T, Bonifacino JS. Sorting of lysosomal proteins. Biochim Biophys Acta. 2009 Apr;1793(4):605-14.

75. Zachos C, Blanz J, Saftig P, Schwake M. A critical histidine residue within LIMP-2 mediates pH sensitive binding to its ligand beta-glucocerebrosidase. Traffic. 2012 Aug;13(8):1113-23.
76. Reczek D, Schwake M, Schroder J, Hughes H, Blanz J, Jin X, et al. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. Cell. 2007 Nov 16;131(4):770-83.
77. Zhao Y, Ren J, Padilla-Parra S, Fry EE, Stuart DI. Lysosome sorting of beta-glucocerebrosidase by LIMP-2 is targeted by the mannose 6-phosphate receptor. Nat Commun. 2014;5:4321.
78. Blanz J, Zunke F, Markmann S, Damme M, Braulke T, Saftig P, et al. Mannose 6-phosphate-independent Lysosomal Sorting of LIMP-2. Traffic. 2015 Oct;16(10):1127-36.
79. Berkovic SF, Dibbens LM, Oshlack A, Silver JD, Katerelos M, Vears DF, et al. Array-based gene discovery with three unrelated subjects shows SCARB2/LIMP-2 deficiency causes myoclonus epilepsy and glomerulosclerosis. Am J Hum Genet. 2008 Mar;82(3):673-84.
80. Dardis A, Filocamo M, Grossi S, Ciana G, Franceschetti S, Dominissini S, et al. Biochemical and molecular findings in a patient with myoclonic epilepsy due to a mistarget of the beta-glucosidase enzyme. Mol Genet Metab. 2009 Aug;97(4):309-11.
81. Velayati A, DePaolo J, Gupta N, Choi JH, Moaven N, Westbroek W, et al. A mutation in SCARB2 is a modifier in Gaucher disease. Hum Mutat. 2011 Nov;32(11):1232-8.
82. Bendikov-Bar I, Horowitz M. Gaucher disease paradigm: from ERAD to comorbidity. Hum Mutat. 2012 Oct;33(10):1398-407.
83. Ron I, Horowitz M. ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity. Hum Mol Genet. 2005 Aug 15;14(16):2387-98.
84. van Weely S, Brandsma M, Strijland A, Tager JM, Aerts JM. Demonstration of the existence of a second, non-lysosomal glucocerebrosidase that is not deficient in Gaucher disease. Biochim Biophys Acta. 1993 Mar 24;1181(1):55-62.
85. Boot RG, Verhoek M, Donker-Koopman W, Strijland A, van Marle J, Overkleeft HS, et al. Identification of the non-lysosomal glucosylceramidase as beta-glucosidase 2. J Biol Chem. 2007 Jan 12;282(2):1305-12.
86. Koerschen HG, Yildiz Y, Raju DN, Schonauer S, Boenigk W, Jansen V, et al. The non-lysosomal beta-glucosidase GBA2 is a non-integral membrane-associated protein at the ER and Golgi. J Biol Chem. 2013 Dec 17;288(5):3381-93.
87. Matern H, Heinemann H, Legler G, Matern S. Purification and characterization of a microsomal bile acid beta-glucosidase from human liver. J Biol Chem. 1997 Apr 25;272(17):11261-7.
88. Matern H, Boermans H, Lottspeich F, Matern S. Molecular cloning and expression of human bile acid beta-glucosidase. J Biol Chem. 2001 Oct 12;276(41):37929-33.
89. Yildiz Y, Matern H, Thompson B, Allegood JC, Warren RL, Ramirez DM, et al. Mutation of beta-glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility. J Clin Invest. 2006 Nov;116(11):2985-94.
90. Gonzalez-Carmona MA, Sandhoff R, Tacke F, Vogt A, Weber S, Canbay AE, et al. Beta-glucosidase 2 knockout mice with increased glucosylceramide show impaired liver regeneration. Liver Int. 2012 Oct;32(9):1354-62.
91. Ridley CM, Thur KE, Shanahan J, Thillaiappan NB, Shen A, Uhl K, et al. Beta-glucosidase 2 (GBA2) activity and imino sugar pharmacology. J Biol Chem. 2013 Jul 23.
92. Overkleeft HS, Renkema GH, Neele J, Vianello P, Hung IO, Strijland A, et al. Generation of specific deoxynojirimycin-type inhibitors of the non-lysosomal glucosylceramidase. J Biol Chem. 1998 Oct 9;273(41):26522-7.

93. Ghisaidoobe A, Bikker P, de Bruijn AC, Godschalk FD, Rogaar E, Guijt MC, et al. Identification of potent and selective glucosylceramide synthase inhibitors from a library of N-alkylated iminosugars. ACS Med Chem Lett. 2010 Feb 10;2(2):119-23.
94. Martin E, Schule R, Smets K, Rastetter A, Boukhris A, Loureiro JL, et al. Loss of Function of Glucocerebrosidase GBA2 Is Responsible for Motor Neuron Defects in Hereditary Spastic Paraplegia. Am J Hum Genet. 2013 Jan 15.
95. Votsi C, Zamba-Papanicolaou E, Middleton LT, Pantzaris M, Christodoulou K. A novel GBA2 gene missense mutation in spastic ataxia. Ann Hum Genet. 2014 Jan;78(1):13-22.
96. Citterio A, Arnoldi A, Panzeri E, D'Angelo MG, Filosto M, Dilena R, et al. Mutations in CYP2U1, DDHD2 and GBA2 genes are rare causes of complicated forms of hereditary spastic paraparesis. J Neurol. 2014 Feb;261(2):373-81.
97. Hammer MB, Eleuch-Fayache G, Schottlaender LV, Nehdi H, Gibbs JR, Arepalli SK, et al. Mutations in GBA2 Cause Autosomal-Recessive Cerebellar Ataxia with Spasticity. Am J Hum Genet. 2013 Jan 15.
98. Glew RH, Peters SP, Christopher AR. Isolation and characterization of beta-glucosidase from the cytosol of rat kidney cortex. Biochim Biophys Acta. 1976 Jan 23;422(1):179-99.
99. Daniels LB, Coyle PJ, Chiao YB, Glew RH, Labow RS. Purification and characterization of a cytosolic broad specificity beta-glucosidase from human liver. J Biol Chem. 1981 Dec 25;256(24):13004-13.
100. de Graaf M, van Veen IC, van der Meulen-Muileman IH, Gerritsen WR, Pinedo HM, Haisma HJ. Cloning and characterization of human liver cytosolic beta-glycosidase. Biochem J. 2001 Jun 15;356(Pt 3):907-10.
101. Hayashi Y, Okino N, Kakuta Y, Shikanai T, Tani M, Narimatsu H, et al. Klotho-related protein is a novel cytosolic neutral beta-glycosylceramidase. J Biol Chem. 2007 Oct 19;282(42):30889-900.
102. Dekker N, Voorn-Brouwer T, Verhoek M, Wennekes T, Narayan RS, Speijer D, et al. The cytosolic beta-glucosidase GBA3 does not influence type 1 Gaucher disease manifestation. Blood Cells Mol Dis. 2011 Jan 15;46(1):19-26.
103. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. Nature. 1997 Nov 6;390(6655):45-51.
104. Berrin JG, McLauchlan WR, Needs P, Williamson G, Puigserver A, Kroon PA, et al. Functional expression of human liver cytosolic beta-glucosidase in Pichia pastoris. Insights into its role in the metabolism of dietary glucosides. Eur J Biochem. 2002 Jan;269(1):249-58.
105. Colombo V, Lorenz-Meyer H, Semenza G. Small intestinal phlorizin hydrolase: the "beta-glycosidase complex". Biochim Biophys Acta. 1973 Dec 19;327(2):412-24.
106. Arribas JC, Herrero AG, Martin-Lomas M, Canada FJ, He S, Withers SG. Differential mechanism-based labeling and unequivocal activity assignment of the two active sites of intestinal lactase/phlorizin hydrolase. Eur J Biochem. 2000 Dec;267(24):6996-7005.
107. Potter J, Ho MW, Bolton H, Furth AJ, Swallow DM, Griffiths B. Human lactase and the molecular basis of lactase persistence. Biochem Genet. 1985 Jun;23(5-6):423-39.
108. Zecca L, Mesonero JE, Stutz A, Poiree JC, Giudicelli J, Cursio R, et al. Intestinal lactase-phlorizin hydrolase (LPH): the two catalytic sites; the role of the pancreas in pro-LPH maturation. FEBS Lett. 1998 Sep 18;435(2-3):225-8.
109. Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, Kroon PA, McLauchlan R, Faulds CB, et al. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. FEBS Lett. 2000 Feb 25;468(2-3):166-70.

110. Brady RO, Kanfer JN, Shapiro D. Metabolism of Glucocerebrosides. Ii. Evidence of an Enzymatic Deficiency in Gaucher's Disease. Biochem Biophys Res Commun. 1965 Jan 18;18:221-5.
111. Schnabel D, Schroder M, Sandhoff K. Mutation in the sphingolipid activator protein 2 in a patient with a variant of Gaucher disease. FEBS Lett. 1991 Jun 17;284(1):57-9.
112. Diaz-Font A, Cormand B, Santamaria R, Vilageliu L, Grinberg D, Chabas A. A mutation within the saposin D domain in a Gaucher disease patient with normal glucocerebrosidase activity. Hum Genet. 2005 Jul;117(2-3):275-7.
113. Tsuji S, Martin BM, Barranger JA, Stubblefield BK, LaMarca ME, Ginns EI. Genetic heterogeneity in type 1 Gaucher disease: multiple genotypes in Ashkenazic and non-Ashkenazic individuals. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Apr;85(7):2349-52.
114. Tsuji S, Choudary PV, Martin BM, Stubblefield BK, Mayor JA, Barranger JA, et al. A mutation in the human glucocerebrosidase gene in neuronopathic Gaucher's disease. N Engl J Med. 1987 Mar 5;316(10):570-5.
115. Bohlega S, Kambouris M, Shahid M, Al Homsi M, Al Sous W. Gaucher disease with oculomotor apraxia and cardiovascular calcification (Gaucher type IIIC). Neurology. 2000 Jan 11;54(1):261-3.
116. Grabowski GA. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. Lancet. 2008 Oct 4;372(9645):1263-71.
117. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. Jama. 1999 Jan 20;281(3):249-54.
118. Ho MW, O'Brien JS. Gaucher's disease: deficiency of 'acid' -glucosidase and reconstitution of enzyme activity in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 1971 Nov;68(11):2810-3.
119. Atrian S, Lopez-Vinas E, Gomez-Puertas P, Chabas A, Vilageliu L, Grinberg D. An evolutionary and structure-based docking model for glucocerebrosidase-saposin C and glucocerebrosidase-substrate interactions - relevance for Gaucher disease. Proteins. 2008 Feb 15;70(3):882-91.
120. Wilkening G, Linke T, Sandhoff K. Lysosomal degradation on vesicular membrane surfaces. Enhanced glucosylceramide degradation by lysosomal anionic lipids and activators. J Biol Chem. 1998 Nov 13;273(46):30271-8.
121. Vaccaro AM, Ciaffoni F, Tatti M, Salvioli R, Barca A, Tognozzi D, et al. pH-dependent conformational properties of saposins and their interactions with phospholipid membranes. J Biol Chem. 1995 Dec 22;270(51):30576-80.
122. Tamargo RJ, Velayati A, Goldin E, Sidransky E. The role of saposin C in Gaucher disease. Mol Genet Metab. 2012 Jul;106(3):257-63.
123. Kahn MF. [From "primitive spleen epithelioma" to Gaucher's disease. Story of a forerunner]. Rev Med Interne. 2007 Oct;28 Suppl 2:S206-10.
124. Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, Kolodny EH, Mistry P, Pastores G, et al. The Gaucher registry: demographics and disease characteristics of 1698 patients with Gaucher disease. Arch Intern Med. 2000 Oct 9;160(18):2835-43.
125. Gielchinsky Y, Elstein D, Hadas-Halpern I, Lahad A, Abrahamov A, Zimran A. Is there a correlation between degree of splenomegaly, symptoms and hypersplenism? A study of 218 patients with Gaucher disease. Br J Haematol. 1999 Sep;106(3):812-6.
126. Rosenbaum H. Hemorrhagic aspects of Gaucher disease. Rambam Maimonides Med J. 2014 Oct;5(4):e0039.
127. Lester TJ, Grabowski GA, Goldblatt J, Leiderman IZ, Zaroulis CG. Immune thrombocytopenia and Gaucher's disease. Am J Med. 1984 Sep;77(3):569-71.
128. Billett HH, Rizvi S, Sawitsky A. Coagulation abnormalities in patients with Gaucher's disease: effect of therapy. Am J Hematol. 1996 Mar;51(3):234-6.

129. Hollak CE, Levi M, Berends F, Aerts JM, van Oers MH. Coagulation abnormalities in type 1 Gaucher disease are due to low-grade activation and can be partly restored by enzyme supplementation therapy. Br J Haematol. 1997 Mar;96(3):470-6.
130. Deghady A, Marzouk I, El-Shayeb A, Wali Y. Coagulation abnormalities in type 1 Gaucher disease in children. Pediatr Hematol Oncol. 2006 Jul-Aug;23(5):411-7.
131. Mitrovic M, Sumarac Z, Antic D, Bogdanovic A, Elezovic I, Vukosavljevic D, et al. Markers of coagulation activation and enhanced fibrinolysis in Gaucher type 1 patient: Effects of enzyme replacement therapy. Blood Cells Mol Dis. 2012 Jun 15;49(1):58-9.
132. Spectre G, Roth B, Ronen G, Rosengarten D, Elstein D, Zimran A, et al. Platelet adhesion defect in type I Gaucher Disease is associated with a risk of mucosal bleeding. Br J Haematol. 2011 May;153(3):372-8.
133. Mitrovic M, Elezovic I, Miljic P, Suvajdzic N. Acquired von Willebrand syndrome in patients with Gaucher disease. Blood Cells Mol Dis. 2014 Apr;52(4):205-7.
134. Goker-Alpan O. Therapeutic approaches to bone pathology in Gaucher disease: past, present and future. Mol Genet Metab. 2011 Dec;104(4):438-47.
135. Deegan PB, Pavlova E, Tindall J, Stein PE, Bearcroft P, Mehta A, et al. Osseous manifestations of adult Gaucher disease in the era of enzyme replacement therapy. Medicine (Baltimore). 2011 Jan;90(1):52-60.
136. Khan A, Hangartner T, Weinreb NJ, Taylor JS, Mistry PK. Risk factors for fractures and avascular osteonecrosis in type 1 Gaucher disease: a study from the International Collaborative Gaucher Group (ICGG) Gaucher Registry. J Bone Miner Res. 2012 Aug;27(8):1839-48.
137. Mistry PK, Weinreb NJ, Kaplan P, Cole JA, Gwosdow AR, Hangartner T. Osteopenia in Gaucher disease develops early in life: response to imiglucerase enzyme therapy in children, adolescents and adults. Blood Cells Mol Dis. 2011 Jan 15;46(1):66-72.
138. Sims KB, Pastores GM, Weinreb NJ, Barranger J, Rosenbloom BE, Packman S, et al. Improvement of bone disease by imiglucerase (Cerezyme) therapy in patients with skeletal manifestations of type 1 Gaucher disease: results of a 48-month longitudinal cohort study. Clin Genet. 2008 May;73(5):430-40.
139. Ciana G, Addobbati R, Tamaro G, Leopaldi A, Nevyjel M, Ronfani L, et al. Gaucher disease and bone: laboratory and skeletal mineral density variations during a long period of enzyme replacement therapy. J Inherit Metab Dis. 2005;28(5):723-32.
140. Rosenthal DI, Doppelt SH, Mankin HJ, Dambrosia JM, Xavier RJ, McKusick KA, et al. Enzyme replacement therapy for Gaucher disease: skeletal responses to macrophage-targeted glucocerebrosidase. Pediatrics. 1995 Oct;96(4 Pt 1):629-37.
141. Wenstrup RJ, Kacena KA, Kaplan P, Pastores GM, Prakash-Cheng A, Zimran A, et al. Effect of enzyme replacement therapy with imiglucerase on BMD in type 1 Gaucher disease. J Bone Miner Res. 2007 Jan;22(1):119-26.
142. Andersson H, Kaplan P, Kacena K, Yee J. Eight-year clinical outcomes of long-term enzyme replacement therapy for 884 children with Gaucher disease type 1. Pediatrics. 2008 Dec;122(6):1182-90.
143. Elstein D, Foldes AJ, Zahrieh D, Cohn GM, Djordjevic M, Brutaru C, et al. Significant and continuous improvement in bone mineral density among type 1 Gaucher disease patients treated with velaglucerase alfa: 69-month experience, including dose reduction. Blood Cells Mol Dis. 2011 Jun 15;47(1):56-61.
144. Weinreb N, Barranger J, Packman S, Prakash-Cheng A, Rosenbloom B, Sims K, et al. Imiglucerase (Cerezyme) improves quality of life in patients with skeletal manifestations of Gaucher disease. Clin Genet. 2007 Jun;71(6):576-88.

145. Pastores GM, Elstein D, Hrebicek M, Zimran A. Effect of miglustat on bone disease in adults with type 1 Gaucher disease: a pooled analysis of three multinational, open-label studies. Clin Ther. 2007 Aug;29(8):1645-54.
146. Lukina E, Watman N, Dragosky M, Pastores GM, Arreguin EA, Rosenbaum H, et al. Eliglustat, an investigational oral therapy for Gaucher disease type 1: Phase 2 trial results after 4 years of treatment. Blood Cells Mol Dis. 2014 Dec;53(4):274-6.
147. Mignot C, Doummar D, Maire I, De Villemeur TB. Type 2 Gaucher disease: 15 new cases and review of the literature. Brain Dev. 2006 Jan;28(1):39-48.
148. Pastores GM. Neuropathic Gaucher disease. Wien Med Wochenschr. 2010 Dec;160(23-24):605-8.
149. Kraoua I, Sedel F, Caillaud C, Froissart R, Stirnemann J, Chaurand G, et al. A French experience of type 3 Gaucher disease: Phenotypic diversity and neurological outcome of 10 patients. Brain Dev. 2011 Feb;33(2):131-9.
150. Tylki-Szymanska A, Vellodi A, El-Beshlawy A, Cole JA, Kolodny E. Neuronopathic Gaucher disease: demographic and clinical features of 131 patients enrolled in the International Collaborative Gaucher Group Neurological Outcomes Subregistry. J Inherit Metab Dis. 2010 Aug;33(4):339-46.
151. Lui K, Commens C, Choong R, Jaworski R. Collodion babies with Gaucher's disease. Arch Dis Child. 1988 Jul;63(7):854-6.
152. Mignot C, Gelot A, Bessieres B, Daffos F, Voyer M, Menez F, et al. Perinatal-lethal Gaucher disease. Am J Med Genet A. 2003 Jul 30;120A(3):338-44.
153. Neudorfer O, Giladi N, Elstein D, Abrahamov A, Turezkite T, Aghai E, et al. Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. QJM. 1996 Sep;89(9):691-4.
154. Tayebi N, Callahan M, Madike V, Stubblefield BK, Orvisky E, Krasnewich D, et al. Gaucher disease and parkinsonism: a phenotypic and genotypic characterization. Mol Genet Metab. 2001 Aug;73(4):313-21.
155. Varkonyi J, Rosenbaum H, Baumann N, MacKenzie JJ, Simon Z, Aharon-Peretz J, et al. Gaucher disease associated with parkinsonism: four further case reports. Am J Med Genet A. 2003 Feb 1;116A(4):348-51.
156. Bembi B, Zambito Marsala S, Sidransky E, Ciana G, Carrozzi M, Zorzon M, et al. Gaucher's disease with Parkinson's disease: clinical and pathological aspects. Neurology. 2003 Jul 8;61(1):99-101.
157. Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. N Engl J Med. 2009 Oct 22;361(17):1651-61.
158. Mao X, Wang T, Peng R, Chang X, Li N, Gu Y, et al. Mutations in GBA and risk of Parkinson's disease: a meta-analysis based on 25 case-control studies. Neurol Res. 2013 Oct;35(8):873-8.
159. Vekrellis K, Xilouri M, Emmanouilidou E, Rideout HJ, Stefanis L. Pathological roles of alpha-synuclein in neurological disorders. Lancet Neurol. 2011 Nov;10(11):1015-25.
160. Ginns EI, Mak SK, Ko N, Karlgren J, Akbarian S, Chou VP, et al. Neuroinflammation and alpha-synuclein accumulation in response to glucocerebrosidase deficiency are accompanied by synaptic dysfunction. Mol Genet Metab. 2014 Feb;111(2):152-62.
161. Mak SK, McCormack AL, Manning-Bog AB, Cuervo AM, Di Monte DA. Lysosomal degradation of alpha-synuclein in vivo. J Biol Chem. 2010 Apr 30;285(18):13621-9.
162. Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. Science. 2004 Aug 27;305(5688):1292-5.
163. Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K, Braak H. 100 years of Lewy pathology. Nat Rev Neurol. 2013 Jan;9(1):13-24.

164. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. Nature. 1997 Aug 28;388(6645):839-40.
165. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science. 1997 Jun 27;276(5321):2045-7.
166. Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S, et al. In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Mar 8;108(10):4194-9.
167. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Schapira AH, Gardiner C, Sargent IL, Wood MJ, et al. Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. Neurobiol Dis. 2011 Jun;42(3):360-7.
168. Lee HJ, Khoshaghideh F, Patel S, Lee SJ. Clearance of alpha-synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway. J Neurosci. 2004 Feb 25;24(8):1888-96.
169. Cullen V, Sardi SP, Ng J, Xu YH, Sun Y, Tomlinson JJ, et al. Acid beta-glucosidase mutants linked to Gaucher disease, Parkinson disease, and Lewy body dementia alter alpha-synuclein processing. Ann Neurol. 2011 Jun;69(6):940-53.
170. Fishbein I, Kuo YM, Giasson BI, Nussbaum RL. Augmentation of phenotype in a transgenic Parkinson mouse heterozygous for a Gaucher mutation. Brain. 2014 Dec;137(Pt 12):3235-47.
171. Manning-Bog AB, Schule B, Langston JW. Alpha-synuclein-glucocerebrosidase interactions in pharmacological Gaucher models: a biological link between Gaucher disease and parkinsonism. Neurotoxicology. 2009 Nov;30(6):1127-32.
172. Dermentzaki G, Dimitriou E, Xilouri M, Michelakakis H, Stefanis L. Loss of beta-glucocerebrosidase activity does not affect alpha-synuclein levels or lysosomal function in neuronal cells. PLoS One. 2013;8(4):e60674.
173. Cleeter MW, Chau KY, Gluck C, Mehta A, Hughes DA, Duchen M, et al. Glucocerebrosidase inhibition causes mitochondrial dysfunction and free radical damage. Neurochem Int. 2013 Jan;62(1):1-7.
174. Goker-Alpan O, Stubblefield BK, Giasson BI, Sidransky E. Glucocerebrosidase is present in alpha-synuclein inclusions in Lewy body disorders. Acta Neuropathol. 2010 Nov;120(5):641-9.
175. Yap TL, Gruschus JM, Velayati A, Westbroek W, Goldin E, Moaven N, et al. Alpha-synuclein interacts with Glucocerebrosidase providing a molecular link between Parkinson and Gaucher diseases. J Biol Chem. 2011 Aug 12;286(32):28080-8.
176. Yap TL, Velayati A, Sidransky E, Lee JC. Membrane-bound alpha-synuclein interacts with glucocerebrosidase and inhibits enzyme activity. Mol Genet Metab. 2013 Jan;108(1):56-64.
177. Mazzulli JR, Xu YH, Sun Y, Knight AL, McLean PJ, Caldwell GA, et al. Gaucher disease glucocerebrosidase and alpha-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. Cell. 2011 Jul 8;146(1):37-52.
178. Gegg ME, Burke D, Heales SJ, Cooper JM, Hardy J, Wood NW, et al. Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. Ann Neurol. 2012 Sep;72(3):455-63.
179. Murphy KE, Gysbers AM, Abbott SK, Tayebi N, Kim WS, Sidransky E, et al. Reduced glucocerebrosidase is associated with increased alpha-synuclein in sporadic Parkinson's disease. Brain. 2014 Mar;137(Pt 3):834-48.
180. Sardi SP, Clarke J, Viel C, Chan M, Tamsett TJ, Treleaven CM, et al. Augmenting CNS glucocerebrosidase activity as a therapeutic strategy for parkinsonism and other Gaucher-related synucleinopathies. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Feb 26;110(9):3537-42.

181. Farfel-Becker T, Vitner EB, Futerman AH. Animal models for Gaucher disease research. Dis Model Mech. 2011 Nov;4(6):746-52.
182. Stephens MC, Bernatsky A, Burachinsky V, Legler G, Kanfer JN. The Gaucher mouse: differential action of conduritol B epoxide and reversibility of its effects. J Neurochem. 1978 May;30(5):1023-7.
183. Datta SC, Radin NS. Glucosylceramide and the level of the glucosidase-stimulating proteins. Lipids. 1986 Nov;21(11):702-9.
184. Datta SC, Radin NS. Normalization of liver glucosylceramide levels in the "Gaucher" mouse by phosphatidylserine injection. Biochem Biophys Res Commun. 1988 Apr 15;152(1):155-60.
185. Marshall J, McEachern KA, Kyros JA, Nietupski JB, Budzinski T, Ziegler RJ, et al. Demonstration of feasibility of in vivo gene therapy for Gaucher disease using a chemically induced mouse model. Mol Ther. 2002 Aug;6(2):179-89.
186. Xu YH, Reboulet R, Quinn B, Huelsken J, Witte D, Grabowski GA. Dependence of reversibility and progression of mouse neuronopathic Gaucher disease on acid beta-glucosidase residual activity levels. Mol Genet Metab. 2008 Jun;94(2):190-203.
187. Tybulewicz VL, Tremblay ML, LaMarca ME, Willemsen R, Stubblefield BK, Winfield S, et al. Animal model of Gaucher's disease from targeted disruption of the mouse glucocerebrosidase gene. Nature. 1992 Jun 4;357(6377):407-10.
188. Sidransky E, Sherer DM, Ginns EI. Gaucher disease in the neonate: a distinct Gaucher phenotype is analogous to a mouse model created by targeted disruption of the glucocerebrosidase gene. Pediatr Res. 1992 Oct;32(4):494-8.
189. Holleran WM, Ginns EI, Menon GK, Grundmann JU, Fartasch M, McKinney CE, et al. Consequences of beta-glucocerebrosidase deficiency in epidermis. Ultrastructure and permeability barrier alterations in Gaucher disease. J Clin Invest. 1994 Apr;93(4):1756-64.
190. Kim EY, Hong YB, Go SH, Lee B, Jung SC. Downregulation of neurotrophic factors in the brain of a mouse model of Gaucher disease; implications for neuronal loss in Gaucher disease. Exp Mol Med. 2006 Aug 31;38(4):348-56.
191. Hong YB, Kim EY, Jung SC. Down-regulation of Bcl-2 in the fetal brain of the Gaucher disease mouse model: a possible role in the neuronal loss. J Hum Genet. 2004;49(7):349-54.
192. Liu Y, Suzuki K, Reed JD, Grinberg A, Westphal H, Hoffmann A, et al. Mice with type 2 and 3 Gaucher disease point mutations generated by a single insertion mutagenesis procedure. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Mar 3;95(5):2503-8.
193. Mizukami H, Mi Y, Wada R, Kono M, Yamashita T, Liu Y, et al. Systemic inflammation in glucocerebrosidase-deficient mice with minimal glucosylceramide storage. J Clin Invest. 2002 May;109(9):1215-21.
194. Khanna R, Benjamin ER, Pellegrino L, Schilling A, Rigat BA, Soska R, et al. The pharmacological chaperone isofagomine increases the activity of the Gaucher disease L444P mutant form of beta-glucosidase. Febs J. 2010 Apr;277(7):1618-38.
195. Xu YH, Quinn B, Witte D, Grabowski GA. Viable mouse models of acid beta-glucosidase deficiency: the defect in Gaucher disease. Am J Pathol. 2003 Nov;163(5):2093-101.
196. Sun Y, Liou B, Quinn B, Ran H, Xu YH, Grabowski GA. In vivo and ex vivo evaluation of L-type calcium channel blockers on acid beta-glucosidase in Gaucher disease mouse models. PLoS One. 2009;4(10):e7320.
197. McEachern KA, Nietupski JB, Chuang WL, Armentano D, Johnson J, Hutto E, et al. AAV8-mediated expression of glucocerebrosidase ameliorates the storage pathology in the visceral organs of a mouse model of Gaucher disease. J Gene Med. 2006 Jun;8(6):719-29.

198. McEachern KA, Fung J, Komarnitsky S, Siegel CS, Chuang WL, Hutto E, et al. A specific and potent inhibitor of glucosylceramide synthase for substrate inhibition therapy of Gaucher disease. Mol Genet Metab. 2007 Jul;91(3):259-67.
199. Marshall J, McEachern KA, Chuang WL, Hutto E, Siegel CS, Shayman JA, et al. Improved management of lysosomal glucosylceramide levels in a mouse model of type 1 Gaucher disease using enzyme and substrate reduction therapy. J Inherit Metab Dis. 2010 Jun;33(3):281-9.
200. Enquist IB, Nilsson E, Ooka A, Mansson JE, Olsson K, Ehinger M, et al. Effective cell and gene therapy in a murine model of Gaucher disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Sep 12;103(37):13819-24.
201. Enquist IB, Nilsson E, Mansson JE, Ehinger M, Richter J, Karlsson S. Successful low-risk hematopoietic cell therapy in a mouse model of type 1 Gaucher disease. Stem Cells. 2009 Mar;27(3):744-52.
202. Sinclair GB, Jevon G, Colobong KE, Randall DR, Choy FY, Clarke LA. Generation of a conditional knockout of murine glucocerebrosidase: utility for the study of Gaucher disease. Mol Genet Metab. 2007 Feb;90(2):148-56.
203. Mistry PK, Liu J, Yang M, Nottoli T, McGrath J, Jain D, et al. Glucocerebrosidase gene-deficient mouse recapitulates Gaucher disease displaying cellular and molecular dysregulation beyond the macrophage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Nov 9;107(45):19473-8.
204. Enquist IB, Lo Bianco C, Ooka A, Nilsson E, Mansson JE, Ehinger M, et al. Murine models of acute neuronopathic Gaucher disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Oct 30;104(44):17483-8.
205. Cabrera-Salazar MA, Bercury SD, Ziegler RJ, Marshall J, Hodges BL, Chuang WL, et al. Intracerebroventricular delivery of glucocerebrosidase reduces substrates and increases lifespan in a mouse model of neuronopathic Gaucher disease. Exp Neurol. 2010 Oct;225(2):436-44.
206. Hartley WJ, Blakemore WF. Neurovisceral glucocerebroside storage (Gaucher's disease) in a dog. Vet Pathol. 1973;10(3):191-201.
207. Van De Water NS, Jolly RD, Farrow BR. Canine Gaucher disease--the enzymic defect. Aust J Exp Biol Med Sci. 1979 Oct;57(5):551-4.
208. Karageorgos L, Lancaster MJ, Nimmo JS, Hopwood JJ. Gaucher disease in sheep. J Inherit Metab Dis. 2010 Feb;34(1):209-15.
209. Brady RO, Kanfer JN, Bradley RM, Shapiro D. Demonstration of a deficiency of glucocerebroside-cleaving enzyme in Gaucher's disease. J Clin Invest. 1966 Jul;45(7):1112-5.
210. Beutler E. Enzyme replacement in Gaucher disease. PLoS Med. 2004 Nov;1(2):e21.
211. Achord DT, Brot FE, Bell CE, Sly WS. Human beta-glucuronidase: in vivo clearance and in vitro uptake by a glycoprotein recognition system on reticuloendothelial cells. Cell. 1978 Sep;15(1):269-78.
212. Furbish FS, Steer CJ, Krett NL, Barranger JA. Uptake and distribution of placental glucocerebrosidase in rat hepatic cells and effects of sequential deglycosylation. Biochim Biophys Acta. 1981 Apr 3;673(4):425-34.
213. Barton NW, Brady RO, Dambrosia JM, Di Bisceglie AM, Doppelt SH, Hill SC, et al. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency--macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. N Engl J Med. 1991 May 23;324(21):1464-70.
214. Zimran A, Elstein D, Abrahamov A. Enzyme replacement therapy in type 1 and type 3 Gaucher's disease. Lancet. 1995 Feb 18;345(8947):451-2.
215. Beutler E, Kay A, Saven A, Garver P, Thurston D, Dawson A, et al. Enzyme replacement therapy for Gaucher disease. Blood. 1991 Sep 1;78(5):1183-9.

216. Grabowski GA, Barton NW, Pastores G, Dambrosia JM, Banerjee TK, McKee MA, et al. Enzyme therapy in type 1 Gaucher disease: comparative efficacy of mannose-terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources. Ann Intern Med. 1995 Jan 1;122(1):33-9.
217. Gonzalez DE, Turkia HB, Lukina EA, Kisinovsky I, Dridi MF, Elstein D, et al. Enzyme replacement therapy with velaglucerase alfa in Gaucher disease: Results from a randomized, double-blind, multinational, Phase 3 study. Am J Hematol. 2013 Mar;88(3):166-71.
218. Zimran A, Brill-Almon E, Chertkoff R, Petakov M, Blanco-Favela F, Munoz ET, et al. Pivotal trial with plant cell-expressed recombinant glucocerebrosidase, taliglucerase alfa, a novel enzyme replacement therapy for Gaucher disease. Blood. 2011 Nov 24;118(22):5767-73.
219. Weinreb NJ, Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, Kolodny EH, Mistry P, et al. Effectiveness of enzyme replacement therapy in 1028 patients with type 1 Gaucher disease after 2 to 5 years of treatment: a report from the Gaucher Registry. Am J Med. 2002 Aug 1;113(2):112-9.
220. Weinreb NJ, Goldblatt J, Villalobos J, Charrow J, Cole JA, Kerstenetzky M, et al. Long-term clinical outcomes in type 1 Gaucher disease following 10 years of imiglucerase treatment. J Inherit Metab Dis. 2012 May;36(3):543-53.
221. Ben Turkia H, Gonzalez DE, Barton NW, Zimran A, Kabra M, Lukina EA, et al. Velaglucerase alfa enzyme replacement therapy compared with imiglucerase in patients with Gaucher disease. Am J Hematol. 2013 Mar;88(3):179-84.
222. Platt FM, Neises GR, Dwek RA, Butters TD. N-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. J Biol Chem. 1994 Mar 18;269(11):8362-5.
223. Cox T, Lachmann R, Hollak C, Aerts J, van Weely S, Hrebicek M, et al. Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. Lancet. 2000 Apr 29;355(9214):1481-5.
224. Elstein D, Hollak C, Aerts JM, van Weely S, Maas M, Cox TM, et al. Sustained therapeutic effects of oral miglustat (Zavesca, N-butyldeoxynojirimycin, OGT 918) in type I Gaucher disease. J Inherit Metab Dis. 2004;27(6):757-66.
225. Cox TM, Amato D, Hollak CE, Luzy C, Silkey M, Giorgino R, et al. Evaluation of miglustat as maintenance therapy after enzyme therapy in adults with stable type 1 Gaucher disease: a prospective, open-label non-inferiority study. Orphanet J Rare Dis. 2012;7:102.
226. Kuter DJ, Mehta A, Hollak CE, Giraldo P, Hughes D, Belmatoug N, et al. Miglustat therapy in type 1 Gaucher disease: clinical and safety outcomes in a multicenter retrospective cohort study. Blood Cells Mol Dis. 2013 Aug;51(2):116-24.
227. Lukina E, Watman N, Arreguin EA, Dragosky M, Iastrebner M, Rosenbaum H, et al. Improvement in hematological, visceral, and skeletal manifestations of Gaucher disease type 1 with oral eliglustat tartrate (Genz-112638) treatment: 2-year results of a phase 2 study. Blood. 2010 Nov 18;116(20):4095-8.
228. Mistry PK, Lukina E, Ben Turkia H, Amato D, Baris H, Dasouki M, et al. Effect of oral eliglustat on splenomegaly in patients with Gaucher disease type 1: the ENGAGE randomized clinical trial. Jama. 2015 Feb 17;313(7):695-706.
229. Cox TM, Drelichman G, Cravo R, Balwani M, Burrow TA, Martins AM, et al. Eliglustat compared with imiglucerase in patients with Gaucher's disease type 1 stabilised on enzyme replacement therapy: a phase 3, randomised, open-label, non-inferiority trial. Lancet. 2015 Jun 13;385(9985):2355-62.
230. Aghion H. La maladie de Gaucher dans l'enfance. Thèse. 1934;Paris.

231. Nilsson O, Mansson JE, Hakansson G, Svennerholm L. The occurrence of psychosine and other glycolipids in spleen and liver from the three major types of Gaucher's disease. Biochim Biophys Acta. 1982 Sep 14;712(3):453-63.
232. Orvisky E, Park JK, LaMarca ME, Ginns EI, Martin BM, Tayebi N, et al. Glucosylsphingosine accumulation in tissues from patients with Gaucher disease: correlation with phenotype and genotype. Mol Genet Metab. 2002 Aug;76(4):262-70.
233. Gornati R, Berra B, Montorfano G, Martini C, Ciana G, Ferrari P, et al. Glycolipid analysis of different tissues and cerebrospinal fluid in type II Gaucher disease. J Inherit Metab Dis. 2002 Feb;25(1):47-55.
234. Nilsson O, Hakansson G, Dreborg S, Groth CG, Svennerholm L. Increased cerebroside concentration in plasma and erythrocytes in Gaucher disease: significant differences between type I and type III. Clin Genet. 1982 Nov;22(5):274-9.
235. Gornati R, Bembi B, Tong X, Boscolo R, Berra B. Total glycolipid and glucosylceramide content in serum and urine of patients with Gaucher's disease type 3 before and after enzyme replacement therapy. Clin Chim Acta. 1998 Mar 23;271(2):151-61.
236. Dekker N, van Dussen L, Hollak CE, Overkleeft H, Scheij S, Ghauharali K, et al. Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response. Blood. 2011 Oct 20;118(16):e118-27.
237. Ferraz MJ, Marques AR, Appelman MD, Verhoek M, Strijland A, Mirzaian M, et al. Lysosomal glycosphingolipid catabolism by acid ceramidase: formation of glycosphingoid bases during deficiency of glycosidases. FEBS Lett. 2016 Mar;590(6):716-25.
238. Cox TM. Gaucher disease: understanding the molecular pathogenesis of sphingolipidoses. J Inherit Metab Dis. 2001;24 Suppl 2:106-21; discussion 87-8.
239. Aerts JM, Hollak C, Boot R, Groener A. Biochemistry of glycosphingolipid storage disorders: implications for therapeutic intervention. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2003 May 29;358(1433):905-14.
240. Bodennec J, Pelled D, Riebeling C, Trajkovic S, Futerman AH. Phosphatidylcholine synthesis is elevated in neuronal models of Gaucher disease due to direct activation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase by glucosylceramide. Faseb J. 2002 Nov;16(13):1814-6.
241. Trajkovic-Bodennec S, Bodennec J, Futerman AH. Phosphatidylcholine metabolism is altered in a monocyte-derived macrophage model of Gaucher disease but not in lymphocytes. Blood Cells Mol Dis. 2004 Jul-Aug;33(1):77-82.
242. Korkotian E, Schwarz A, Pelled D, Schwarzmann G, Segal M, Futerman AH. Elevation of intracellular glucosylceramide levels results in an increase in endoplasmic reticulum density and in functional calcium stores in cultured neurons. J Biol Chem. 1999 Jul 30;274(31):21673-8.
243. Lloyd-Evans E, Pelled D, Riebeling C, Futerman AH. Lyso-glycosphingolipids mobilize calcium from brain microsomes via multiple mechanisms. Biochem J. 2003 Nov 1;375(Pt 3):561-5.
244. Pelled D, Trajkovic-Bodennec S, Lloyd-Evans E, Sidransky E, Schiffmann R, Futerman AH. Enhanced calcium release in the acute neuronopathic form of Gaucher disease. Neurobiol Dis. 2005 Feb;18(1):83-8.
245. Ginzburg L, Kacher Y, Futerman AH. The pathogenesis of glycosphingolipid storage disorders. Semin Cell Dev Biol. 2004 Aug;15(4):417-31.
246. Pennelli N, Scaravilli F, Zacchello F. The morphogenesis of Gaucher cells investigated by electron microscopy. Blood. 1969 Sep;34(3):331-47.
247. Naito M, Takahashi K, Hojo H. An ultrastructural and experimental study on the development of tubular structures in the lysosomes of Gaucher cells. Lab Invest. 1988 May;58(5):590-8.

248. Bitton A, Etzell J, Grenert JP, Wang E. Erythrophagocytosis in Gaucher cells. Arch Pathol Lab Med. 2004 Oct;128(10):1191-2.
249. Parkin JL, Brunning RD. Pathology of the Gaucher cell. Prog Clin Biol Res. 1982;95:151-75.
250. Florena AM, Franco V, Campesi G. Immunophenotypical comparison of Gaucher's and pseudo-Gaucher cells. Pathol Int. 1996 Feb;46(2):155-60.
251. Boven LA, van Meurs M, Boot RG, Mehta A, Boon L, Aerts JM, et al. Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. Am J Clin Pathol. 2004 Sep;122(3):359-69.
252. Barak V, Acker M, Nisman B, Kalickman I, Abrahamov A, Zimran A, et al. Cytokines in Gaucher's disease. Eur Cytokine Netw. 1999 Jun;10(2):205-10.
253. Hollak CE, Evers L, Aerts JM, van Oers MH. Elevated levels of M-CSF, sCD14 and IL8 in type 1 Gaucher disease. Blood Cells Mol Dis. 1997 Aug;23(2):201-12.
254. Berger J, Lecourt S, Vanneaux V, Rapatel C, Boisgard S, Caillaud C, et al. Glucocerebrosidase deficiency dramatically impairs human bone marrow haematopoiesis in an in vitro model of Gaucher disease. Br J Haematol. 2010 Jul;150(1):93-101.
255. Nair S, Branagan AR, Liu J, Boddupalli CS, Mistry PK, Dhodapkar MV. Clonal Immunoglobulin against Lysolipids in the Origin of Myeloma. N Engl J Med. 2016 Feb 11;374(6):555-61.
256. Roversi FM, Galdieri LC, Grego BH, Souza FG, Micheletti C, Martins AM, et al. Blood oxidative stress markers in Gaucher disease patients. Clin Chim Acta. 2006 Feb;364(1-2):316-20.
257. Casal JA, Lacerda L, Perez LF, Pinto RA, Clara Sa Miranda M, Carlos Tutor J. Relationships between serum markers of monocyte/macrophage activation in type 1 Gaucher's disease. Clin Chem Lab Med. 2002 Jan;40(1):52-5.
258. Liel Y, Rudich A, Nagauker-Shriker O, Yermiyahu T, Levy R. Monocyte dysfunction in patients with Gaucher disease: evidence for interference of glucocerebroside with superoxide generation. Blood. 1994 May 1;83(9):2646-53.
259. Deganuto M, Pittis MG, Pines A, Dominissini S, Kelley MR, Garcia R, et al. Altered intracellular redox status in Gaucher disease fibroblasts and impairment of adaptive response against oxidative stress. J Cell Physiol. 2007 Jul;212(1):223-35.
260. Lloyd-Evans E, Pelled D, Riebeling C, Bodennec J, de-Morgan A, Waller H, et al. Glucosylceramide and glucosylsphingosine modulate calcium mobilization from brain microsomes via different mechanisms. J Biol Chem. 2003 Jun 27;278(26):23594-9.
261. Lieberman AP, Puertollano R, Raben N, Slaugenhaupt S, Walkley SU, Ballabio A. Autophagy in lysosomal storage disorders. Autophagy. 2012 May 1;8(5):719-30.
262. Vaccaro AM, Motta M, Tatti M, Scarpa S, Masuelli L, Bhat M, et al. Saposin C mutations in Gaucher disease patients resulting in lysosomal lipid accumulation, saposin C deficiency, but normal prosaposin processing and sorting. Hum Mol Genet. 2010 Aug 1;19(15):2987-97.
263. Sun Y, Liou B, Ran H, Skelton MR, Williams MT, Vorhees CV, et al. Neuronopathic Gaucher disease in the mouse: viable combined selective saposin C deficiency and mutant glucocerebrosidase (V394L) mice with glucosylsphingosine and glucosylceramide accumulation and progressive neurological deficits. Hum Mol Genet. 2010 Mar 15;19(6):1088-97.
264. Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, et al. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. Science. 2009 Jul 24;325(5939):473-7.

265. Medina DL, Fraldi A, Bouche V, Annunziata F, Mansueto G, Spampanato C, et al. Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance. Dev Cell. 2011 Sep 13;21(3):421-30.
266. Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S, et al. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. Science. 2011 Jun 17;332(6036):1429-33.
267. Song W, Wang F, Savini M, Ake A, di Ronza A, Sardiello M, et al. TFEB regulates lysosomal proteostasis. Hum Mol Genet. 2013 May 15;22(10):1994-2009.
268. Vitner EB, Salomon R, Farfel-Becker T, Meshcheriakova A, Ali M, Klein AD, et al. RIPK3 as a potential therapeutic target for Gaucher's disease. 2014 Feb;20(2):204-8.
269. Lavie Y, Cao H, Bursten SL, Giuliano AE, Cabot MC. Accumulation of glucosylceramides in multidrug-resistant cancer cells. J Biol Chem. 1996 Aug 9;271(32):19530-6.
270. Lucci A, Cho WI, Han TY, Giuliano AE, Morton DL, Cabot MC. Glucosylceramide: a marker for multiple-drug resistant cancers. Anticancer Res. 1998 Jan-Feb;18(1B):475-80.
271. Lavie Y, Fiucci G, Liscovitch M. Upregulation of caveolin in multidrug resistant cancer cells: functional implications. Adv Drug Deliv Rev. 2001 Jul 28;49(3):317-23.
272. Liu YY, Han TY, Giuliano AE, Cabot MC. Expression of glucosylceramide synthase, converting ceramide to glucosylceramide, confers adriamycin resistance in human breast cancer cells. J Biol Chem. 1999 Jan 8;274(2):1140-6.
273. Liu YY, Han TY, Giuliano AE, Ichikawa S, Hirabayashi Y, Cabot MC. Glycosylation of ceramide potentiates cellular resistance to tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. Exp Cell Res. 1999 Nov 1;252(2):464-70.
274. Itoh M, Kitano T, Watanabe M, Kondo T, Yabu T, Taguchi Y, et al. Possible role of ceramide as an indicator of chemoresistance: decrease of the ceramide content via activation of glucosylceramide synthase and sphingomyelin synthase in chemoresistant leukemia. Clin Cancer Res. 2003 Jan;9(1):415-23.
275. Ogretmen B, Schady D, Usta J, Wood R, Kraveka JM, Luberto C, et al. Role of ceramide in mediating the inhibition of telomerase activity in A549 human lung adenocarcinoma cells. J Biol Chem. 2001 Jul 6;276(27):24901-10.
276. Liu YY, Hill RA, Li YT. Ceramide glycosylation catalyzed by glucosylceramide synthase and cancer drug resistance. Adv Cancer Res. 2013;117:59-89.
277. Liu YY, Han TY, Giuliano AE, Hansen N, Cabot MC. Uncoupling ceramide glycosylation by transfection of glucosylceramide synthase antisense reverses adriamycin resistance. J Biol Chem. 2000 Mar 10;275(10):7138-43.
278. Guerrera M, Ladisch S. N-butyldeoxynojirimycin inhibits murine melanoma cell ganglioside metabolism and delays tumor onset. Cancer Lett. 2003 Nov 10;201(1):31-40.
279. Weiss M, Hettmer S, Smith P, Ladisch S. Inhibition of melanoma tumor growth by a novel inhibitor of glucosylceramide synthase. Cancer Res. 2003 Jul 1;63(13):3654-8.
280. Liu YY, Gupta V, Patwardhan GA, Bhinge K, Zhao Y, Bao J, et al. Glucosylceramide synthase upregulates MDR1 expression in the regulation of cancer drug resistance through cSrc and beta-catenin signaling. Mol Cancer. 2010;9:145.
281. Tepper AD, Diks SH, van Blitterswijk WJ, Borst J. Glucosylceramide synthase does not attenuate the ceramide pool accumulating during apoptosis induced by CD95 or anti-cancer regimens. J Biol Chem. 2000 Nov 3;275(44):34810-7.
282. Veldman RJ, Mita A, Cuvillier O, Garcia V, Klappe K, Medin JA, et al. The absence of functional glucosylceramide synthase does not sensitize melanoma cells for anticancer drugs. Faseb J. 2003 Jun;17(9):1144-6.
283. Liu YY, Patwardhan GA, Xie P, Gu X, Giuliano AE, Cabot MC. Glucosylceramide synthase, a factor in modulating drug resistance, is overexpressed in metastatic breast carcinoma. Int J Oncol. 2011 Aug;39(2):425-31.

284. Sun CC, Zhang Z, Zhang SY, Li J, Li ZL, Kong CZ. Up-regulation of glucosylceramide synthase in urinary bladder neoplasms. Urol Oncol. 2012 Jul-Aug;30(4):444-9.
285. Ruckhaberle E, Karn T, Hanker L, Gatje R, Metzler D, Holtrich U, et al. Prognostic relevance of glucosylceramide synthase (GCS) expression in breast cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 2009 Jan;135(1):81-90.
286. Xie P, Shen YF, Shi YP, Ge SM, Gu ZH, Wang J, et al. Overexpression of glucosylceramide synthase in associated with multidrug resistance of leukemia cells. Leuk Res. 2008 Mar;32(3):475-80.
287. Jones J, Otu H, Spentzos D, Kolia S, Inan M, Beecken WD, et al. Gene signatures of progression and metastasis in renal cell cancer. Clin Cancer Res. 2005 Aug 15;11(16):5730-9.
288. Abe A, Radin NS, Shayman JA. Induction of glucosylceramide synthase by synthase inhibitors and ceramide. Biochim Biophys Acta. 1996 Feb 16;1299(3):333-41.
289. Komori H, Ichikawa S, Hirabayashi Y, Ito M. Regulation of UDP-glucose:ceramide glucosyltransferase-1 by ceramide. FEBS Lett. 2000 Jun 23;475(3):247-50.
290. Liu YY, Yu JY, Yin D, Patwardhan GA, Gupta V, Hirabayashi Y, et al. A role for ceramide in driving cancer cell resistance to doxorubicin. Faseb J. 2008 Jul;22(7):2541-51.
291. Uchida Y, Itoh M, Taguchi Y, Yamaoka S, Umehara H, Ichikawa S, et al. Ceramide reduction and transcriptional up-regulation of glucosylceramide synthase through doxorubicin-activated Sp1 in drug-resistant HL-60/ADR cells. Cancer Res. 2004 Sep 1;64(17):6271-9.
292. Kimura Y, Morita SY, Matsuo M, Ueda K. Mechanism of multidrug recognition by MDR1/ABCB1. Cancer Sci. 2007 Sep;98(9):1303-10.
293. Gouaze-Andersson V, Yu JY, Kreitenberg AJ, Bielawska A, Giuliano AE, Cabot MC. Ceramide and glucosylceramide upregulate expression of the multidrug resistance gene MDR1 in cancer cells. Biochim Biophys Acta. 2007 Dec;1771(12):1407-17.
294. Gouaze V, Yu JY, Bleicher RJ, Han TY, Liu YY, Wang H, et al. Overexpression of glucosylceramide synthase and P-glycoprotein in cancer cells selected for resistance to natural product chemotherapy. Mol Cancer Ther. 2004 May;3(5):633-9.
295. Lim JC, Kania KD, Wijesuriya H, Chawla S, Sethi JK, Pulaski L, et al. Activation of beta-catenin signalling by GSK-3 inhibition increases p-glycoprotein expression in brain endothelial cells. J Neurochem. 2008 Aug;106(4):1855-65.
296. Yamada T, Takaoka AS, Naishiro Y, Hayashi R, Maruyama K, Maesawa C, et al. Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/beta-catenin complex in early colorectal carcinogenesis. Cancer Res. 2000 Sep 1;60(17):4761-6.
297. Benjamin D, Joshua H, Djaldetti M, Hazaz B, Pinkhas J. Nonsecretory IgD-kappa multiple myeloma in a patient with Gaucher's disease. Scand J Haematol. 1979 Feb;22(2):179-84.
298. Bruckstein AH, Karanas A, Dire JJ. Gaucher's disease associated with Hodgkin's disease. Am J Med. 1980 Apr;68(4):610-3.
299. Burstein Y, Rechavi G, Rausen AR, Frisch B, Spirer Z. Association of Gaucher's disease and lymphoid malignancy in 2 children. Scand J Haematol. 1985 Oct;35(4):445-7.
300. Chang-Lo M, Yam LT, Rubenstone AI, Schwartz SO. Gaucher's disease associated with chronic lymphocytic leukaemia, gout and carcinoma. J Pathol. 1975 Aug;116(4):203-7.
301. Corbett GM, Darbyshire PJ, Besley GT, Parker AC. Adult Gaucher disease in association with acute leukaemia. Postgrad Med J. 1987 Oct;63(744):899-900.
302. Garfinkel D, Sidi Y, Ben-Bassat M, Salomon F, Hazaz B, Pinkhas J. Coexistence of Gaucher's disease and multiple myeloma. Arch Intern Med. 1982 Nov;142(12):2229-30.
303. Lee RE. The pathology of Gaucher disease. Prog Clin Biol Res. 1982;95:177-217.

304. Marti GE, Ryan ET, Papadopoulos NM, Filling-Katz M, Barton N, Fleischer TA, et al. Polyclonal B-cell lymphocytosis and hypergammaglobulinemia in patients with Gaucher disease. Am J Hematol. 1988 Dec;29(4):189-94.
305. de Fost M, Out TA, de Wilde FA, Tjin EP, Pals ST, van Oers MH, et al. Immunoglobulin and free light chain abnormalities in Gaucher disease type I: data from an adult cohort of 63 patients and review of the literature. Ann Hematol. 2008 Jun;87(6):439-49.
306. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. N Engl J Med. 2002 Feb 21;346(8):564-9.
307. Shiran A, Brenner B, Laor A, Tatarsky I. Increased risk of cancer in patients with Gaucher disease. Cancer. 1993 Jul 1;72(1):219-24.
308. Rosenbloom BE, Weinreb NJ, Zimran A, Kacena KA, Charrow J, Ward E. Gaucher disease and cancer incidence: a study from the Gaucher Registry. Blood. 2005 Jun 15;105(12):4569-72.
309. de Fost M, Vom Dahl S, Weverling GJ, Brill N, Brett S, Haussinger D, et al. Increased incidence of cancer in adult Gaucher disease in Western Europe. Blood Cells Mol Dis. 2006 Jan-Feb;36(1):53-8.
310. Landgren O, Turesson I, Gridley G, Caporaso NE. Risk of malignant disease among 1525 adult male US Veterans with Gaucher disease. Arch Intern Med. 2007 Jun 11;167(11):1189-94.
311. Weinreb NJ, Andersson HC, Banikazemi M, Barranger J, Beutler E, Charrow J, et al. Prevalence of type 1 Gaucher disease in the United States. Arch Intern Med. 2008 Feb 11;168(3):326-7; author reply 7-8.
312. Taddei TH, Kacena KA, Yang M, Yang R, Malhotra A, Boxer M, et al. The underrecognized progressive nature of N370S Gaucher disease and assessment of cancer risk in 403 patients. Am J Hematol. 2009 Apr;84(4):208-14.
313. Arends M, van Dussen L, Biegstraaten M, Hollak CE. Malignancies and monoclonal gammopathy in Gaucher disease; a systematic review of the literature. Br J Haematol. 2013 Jun;161(6):832-42.
314. Shoenfeld Y, Gallant LA, Shaklai M, Livni E, Djaldetti M, Pinkhas J. Gaucher's disease: a disease with chronic stimulation of the immune system. Arch Pathol Lab Med. 1982 Aug;106(8):388-91.
315. Castaneda JA, Lim MJ, Cooper JD, Pearce DA. Immune system irregularities in lysosomal storage disorders. Acta Neuropathol. 2008 Feb;115(2):159-74.
316. Boot RG, Verhoek M, de Fost M, Hollak CE, Maas M, Bleijlevens B, et al. Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention. Blood. 2004 Jan 1;103(1):33-9.
317. Michelakakis H, Spanou C, Kondyli A, Dimitriou E, Van Weely S, Hollak CE, et al. Plasma tumor necrosis factor-a (TNF-a) levels in Gaucher disease. Biochim Biophys Acta. 1996 Dec 16;1317(3):219-22.
318. Allen MJ, Myer BJ, Khokher AM, Rushton N, Cox TM. Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: increased release of interleukin-6 and interleukin-10. Qjm. 1997 Jan;90(1):19-25.
319. Braudeau C, Graveleau J, Rimbert M, Neel A, Hamidou M, Grosbois B, et al. Altered innate function of plasmacytoid dendritic cells restored by enzyme replacement therapy in Gaucher disease. Blood Cells Mol Dis. 2013 Apr;50(4):281-8.
320. Burstein Y, Zakuth V, Rechavi G, Spirer Z. Abnormalities of cellular immunity and natural killer cells in Gaucher's disease. J Clin Lab Immunol. 1987 Jul;23(3):149-51.
321. Micheva I, Marinakis T, Repa C, Kouraklis-Symeonidis A, Vlacha V, Anagnostopoulos N, et al. Dendritic cells in patients with type I Gaucher disease are

decreased in number but functionally normal. Blood Cells Mol Dis. 2006 Mar-Apr;36(2):298-307.
322. Brennan PJ, Tatituri RV, Brigl M, Kim EY, Tuli A, Sanderson JP, et al. Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals. Nat Immunol. 2011 Dec;12(12):1202-11.
323. Nair S, Boddupalli CS, Verma R, Liu J, Yang R, Pastores GM, et al. Type II NKT-TFH cells against Gaucher lipids regulate B-cell immunity and inflammation. Blood. 2015 Feb 19;125(8):1256-71.
324. Balreira A, Lacerda L, Miranda CS, Arosa FA. Evidence for a link between sphingolipid metabolism and expression of CD1d and MHC-class II: monocytes from Gaucher disease patients as a model. Br J Haematol. 2005 Jun;129(5):667-76.
325. Balreira A, Cavallari M, Sa Miranda MC, Arosa FA. Uncoupling between CD1d upregulation induced by retinoic acid and conduritol-B-epoxide and iNKT cell responsiveness. Immunobiology. 2010 Jun;215(6):505-13.
326. Pandey MK, Rani R, Zhang W, Setchell K, Grabowski GA. Immunological cell type characterization and Th1-Th17 cytokine production in a mouse model of Gaucher disease. Mol Genet Metab. 2012 Jul;106(3):310-22.
327. Xu YH, Jia L, Quinn B, Zamzow M, Stringer K, Aronow B, et al. Global gene expression profile progression in Gaucher disease mouse models. BMC Genomics. 2011;12:20.
328. Kacher Y, Futerman AH. Impaired IL-10 transcription and release in animal models of Gaucher disease macrophages. Blood Cells Mol Dis. 2009 Jul-Aug;43(1):134-7.
329. Liu J, Halene S, Yang M, Iqbal J, Yang R, Mehal WZ, et al. Gaucher disease gene GBA functions in immune regulation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jun 19;109(25):10018-23.
330. Pavlova EV, Wang SZ, Archer J, Dekker N, Aerts JM, Karlsson S, et al. B cell lymphoma and myeloma in murine Gaucher's disease. J Pathol. 2013 Sep;231(1):88-97.
331. Pavlova EV, Archer J, Wang S, Dekker N, Aerts JM, Karlsson S, et al. Inhibition of UDP-glucosylceramide synthase in mice prevents Gaucher disease-associated B-cell malignancy. J Pathol. 2015 Jan;235(1):113-24.
332. Marsh NL, Elias PM, Holleran WM. Glucosylceramides stimulate murine epidermal hyperproliferation. J Clin Invest. 1995 Jun;95(6):2903-9.
333. Shayman JA, Deshmukh GD, Mahdiyoun S, Thomas TP, Wu D, Barcelon FS, et al. Modulation of renal epithelial cell growth by glucosylceramide. Association with protein kinase C, sphingosine, and diacylglycerol. J Biol Chem. 1991 Dec 5;266(34):22968-74.
334. Natoli TA, Smith LA, Rogers KA, Wang B, Komarnitsky S, Budman Y, et al. Inhibition of glucosylceramide accumulation results in effective blockade of polycystic kidney disease in mouse models. Nat Med. 2010 Jul;16(7):788-92.
335. Chatterjee S, Shi WY, Wilson P, Mazumdar A. Role of lactosylceramide and MAP kinase in the proliferation of proximal tubular cells in human polycystic kidney disease. J Lipid Res. 1996 Jun;37(6):1334-44.
336. Morjani H, Aouali N, Belhoussine R, Veldman RJ, Levade T, Manfait M. Elevation of glucosylceramide in multidrug-resistant cancer cells and accumulation in cytoplasmic droplets. Int J Cancer. 2001 Oct 15;94(2):157-65.
337. Swanton C, Marani M, Pardo O, Warne PH, Kelly G, Sahai E, et al. Regulators of mitotic arrest and ceramide metabolism are determinants of sensitivity to paclitaxel and other chemotherapeutic drugs. Cancer Cell. 2007 Jun;11(6):498-512.
338. Barth BM, Gustafson SJ, Young MM, Fox TE, Shanmugavelandy SS, Kaiser JM, et al. Inhibition of NADPH oxidase by glucosylceramide confers chemoresistance. Cancer Biol Ther. 2010 Dec 1;10(11):1126-36.

339. Kitatani K, Sheldon K, Rajagopalan V, Anelli V, Jenkins RW, Sun Y, et al. Involvement of acid beta-glucosidase 1 in the salvage pathway of ceramide formation. J Biol Chem. 2009 May 8;284(19):12972-8.
340. Sumitomo M, Ohba M, Asakuma J, Asano T, Kuroki T, Asano T, et al. Protein kinase Cdelta amplifies ceramide formation via mitochondrial signaling in prostate cancer cells. J Clin Invest. 2002 Mar;109(6):827-36.
341. Kitatani K, Sheldon K, Anelli V, Jenkins RW, Sun Y, Grabowski GA, et al. Acid beta-glucosidase 1 counteracts p38delta-dependent induction of interleukin-6: possible role for ceramide as an anti-inflammatory lipid. J Biol Chem. 2009 May 8;284(19):12979-88.
342. Liu R, Gao X, Lu Y, Chen H. Meta-analysis of the relationship between Parkinson disease and melanoma. Neurology. 2011 Jun 7;76(23):2002-9.
343. Matsuo Y, Kamitani T. Parkinson's disease-related protein, alpha-synuclein, in malignant melanoma. PLoS One. 2010;5(5):e10481.
344. Israeli E, Yakunin E, Zarbiv Y, Hacohen-Solovich A, Kisos H, Loeb V, et al. alpha-Synuclein expression selectively affects tumorigenesis in mice modeling Parkinson's disease. PLoS One. 2011;6(5):e19622.
345. Goker-Alpan O, Hruska KS, Orvisky E, Kishnani PS, Stubblefield BK, Schiffmann R, et al. Divergent phenotypes in Gaucher disease implicate the role of modifiers. J Med Genet. 2005 Jun;42(6):e37.
346. Biegstraaten M, van Schaik IN, Aerts JM, Langeveld M, Mannens MM, Bour LJ, et al. A monozygotic twin pair with highly discordant Gaucher phenotypes. Blood Cells Mol Dis. 2011 Jan 15;46(1):39-41.
347. Amato D, Stachiw T, Clarke JT, Rivard GE. Gaucher disease: variability in phenotype among siblings. J Inherit Metab Dis. 2004;27(5):659-69.
348. Sidransky E. Gaucher disease: complexity in a "simple" disorder. Mol Genet Metab. 2004 Sep-Oct;83(1-2):6-15.
349. Sorli SC, Colie S, Albinet V, Dubrac A, Touriol C, Guilbaud N, et al. The nonlysosomal beta-glucosidase GBA2 promotes endoplasmic reticulum stress and impairs tumorigenicity of human melanoma cells. Faseb J. 2013 Oct 16.
350. Yahata K, Mori K, Arai H, Koide S, Ogawa Y, Mukoyama M, et al. Molecular cloning and expression of a novel klotho-related protein. J Mol Med (Berl). 2000;78(7):389-94.
351. Lee HJ, Nam KT, Park HS, Kim MA, Lafleur BJ, Aburatani H, et al. Gene expression profiling of metaplastic lineages identifies CDH17 as a prognostic marker in early stage gastric cancer. Gastroenterology. 2010 Jul;139(1):213-25 e3.
352. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem. 1957 May;226(1):497-509.
353. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol. 1959 Aug;37(8):911-7.
354. Munoz-Olaya JM, Matabosch X, Bedia C, Egido-Gabas M, Casas J, Llebaria A, et al. Synthesis and biological activity of a novel inhibitor of dihydroceramide desaturase. ChemMedChem. 2008 Jun;3(6):946-53.
355. Halder K, Banerjee S, Bose A, Majumder S, Majumdar S. Overexpressed PKCdelta downregulates the expression of PKCalpha in B16F10 melanoma: induction of apoptosis by PKCdelta via ceramide generation. PLoS One. 2014;9(3):e91656.
356. Sun Y, Zhang W, Xu YH, Quinn B, Dasgupta N, Liou B, et al. Substrate compositional variation with tissue/region and Gba1 mutations in mouse models--implications for Gaucher disease. PLoS One. 2013;8(3):e57560.
357. Gadola SD, Silk JD, Jeans A, Illarionov PA, Salio M, Besra GS, et al. Impaired selection of invariant natural killer T cells in diverse mouse models of glycosphingolipid lysosomal storage diseases. J Exp Med. 2006 Oct 2;203(10):2293-303.

358. Umansky V, Sevko A, Gebhardt C, Utikal J. Myeloid-derived suppressor cells in malignant melanoma. J Dtsch Dermatol Ges. 2014 Nov;12(11):1021-7.
359. Malek E, de Lima M, Letterio JJ, Kim BG, Finke JH, Driscoll JJ, et al. Myeloid-derived suppressor cells: The green light for myeloma immune escape. Blood Rev. 2016 Apr 12.
360. Kolmakova A, Rajesh M, Zang D, Pili R, Chatterjee S. VEGF recruits lactosylceramide to induce endothelial cell adhesion molecule expression and angiogenesis in vitro and in vivo. Glycoconj J. 2009 Jul;26(5):547-58.
361. Zhou L, Yang K, Andl T, Wickett RR, Zhang Y. Perspective of Targeting Cancer-Associated Fibroblasts in Melanoma. J Cancer. 2015;6(8):717-26.
362. Regenboog M, van Kuilenburg AB, Verheij J, Swinkels DW, Hollak CE. Hyperferritinemia and iron metabolism in Gaucher disease: Potential pathophysiological implications. Blood Rev. 2016 May 27.

Biochimie xxx (2015) 1–14

Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Review

# Glucosylceramidases and malignancies in mammals

Leonardo Astudillo [a, b, c, *], Nicole Therville [a, b], Céline Colacios [a, b], Bruno Ségui [a, b], Nathalie Andrieu-Abadie [a, b], Thierry Levade [a, b, d, **]

[a] Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR1037, Toulouse, France
[b] Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer 2013, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Université de Toulouse, Toulouse, France
[c] Service de Médecine Interne, CHU Purpan, Toulouse, France
[d] Laboratoire de Biochimie Métabolique, Institut Fédératif de Biologie, CHU Purpan, Toulouse, France

ARTICLE INFO

*Article history:*
Received 28 August 2015
Accepted 9 November 2015
Available online xxx

*Keywords:*
Ceramide
Glucosylceramide
Glucosylceramidase
Gaucher disease
Melanoma

ABSTRACT

Sphingolipids represent a major class of lipids that are essential constituents of eukaryotic cells. They are predominantly located in plasma membrane microdomains, and play an important structural role in regulating membrane fluidity. They are also bioactive effectors involved in diverse key cellular functions such as apoptosis and proliferation. The implication of some sphingolipids in cancer is well established whereas that of some others is still a matter of intense investigation.

Glucosylceramide is the backbone of more than 300 structurally different glycosphingolipids including gangliosides and sulfatides, and is essential for mammalian development. Therefore, glucosylceramidases (also named GBA1, GBA2 and GBA3 β-glucosidases), the enzymes that hydrolyse β-glucosylceramide, play important functions. GBA1 is a lysosomal hydrolase whose deficiency causes Gaucher disease, the most prevalent inherited lysosomal storage disorder. GBA2 is a ubiquitous non-lysosomal glucosylceramidase whose mutations have been associated with some forms of hereditary spastic paraplegia. GBA3 is a cytosolic β-glucosidase, mostly present in the kidney, liver, spleen, intestine and lymphocytes of mammals, the function of which is still unclear. Whereas glucosylceramide synthase is implicated in multidrug resistance, the role of glucosylceramide breakdown in cancer is not yet fully appreciated. Defective GBA1 enzyme activity in humans, i.e., Gaucher disease, is associated with an increased risk of multiple myeloma and other malignancies. Putative molecular links between Gaucher disease and cancer, which might implicate the malignant cell and/or its microenvironment, are reviewed. The functions of GBA2 and GBA3 in cancer progression are also discussed.

© 2015 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

**Contents**

1. Introduction ..... 00
2. Glucosylceramide: the backbone of numerous glycolipids ..... 00
3. Glucosylceramidases ..... 00
   3.1. Lysosomal glucosylceramidase ..... 00
      3.1.1. Enzyme structure and properties ..... 00
      3.1.2. Inherited defects affecting lysosomal glucosylceramidase ..... 00
   3.2. Bile acid β-glucosidase (non-lysosomal glucosylceramidase) ..... 00
   3.3. Klotho-related protein (GBA3) ..... 00

*Abbreviations:* ER, endoplasmic reticulum; ERT, enzyme replacement therapy; GlcCer, glucosylceramide; GlcCerase, glucosylceramidase; GCS, glucosylceramide synthase; GD, Gaucher disease; GSL, glycosphingolipid; iNKT, invariant natural killer T cells; MGUS, monoclonal gammopathy of undetermined significance; MDR, multidrug resistance; MM, multiple myeloma; PD, Parkinson disease; P-gp, P-glycoprotein; TNF, tumor necrosis factor-α.

* Corresponding author. INSERM UMR1037, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Oncopole de Toulouse, 2 avenue Hubert Curien, CS 53717, 31037 Toulouse cedex 1, France
** Corresponding author. INSERM UMR1037, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Oncopole de Toulouse, 2 avenue Hubert Curien, CS 53717, 31037 Toulouse cedex 1, France
*E-mail addresses:* leonardo.astudillo31@gmail.com (L. Astudillo), thierry.levade@inserm.fr (T. Levade).

http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.11.009
0300-9084/© 2015 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

Please cite this article in press as: L. Astudillo, et al., Glucosylceramidases and malignancies in mammals, Biochimie (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.11.009

4. Glucosylceramide synthesis and cancer ..... 00
5. Glucosylceramide breakdown and cancer ..... 00
5.1. Lysosomal glucosylceramidase and cancer ..... 00
5.1.1. Malignancies in gaucher disease ..... 00
5.1.2. Underlying causes of malignancies in gaucher disease ..... 00
5.2. Non-lysosomal glucosylceramidase and cancer ..... 00
5.3. Klotho-related protein and cancer ..... 00
6. Concluding remarks ..... 00
Conflict of interest ..... 00
Acknowledgments ..... 00
Supplementary data ..... 00
References ..... 00

## 1. Introduction

Discovered in 1876 by J L.W. Thudichum [1], sphingolipids represent a major class of lipids, being essential constituents of eukaryotic cells. Sphingolipids are found in virtually all animals, plants and fungi and in some prokaryotes. They are located predominantly in the plasma membrane of mammalian cells where they have an important structural role in the regulation of membrane fluidity and, as key elements of the membrane microdomains, of signal transduction events emanating from the cell surface. Sphingolipids are amphipathic molecules. Their hydrophobic region consists of a sphingoid long chain base (usually sphingosine, sphinganine or phytosphingosine) to which a fatty acid of variable chain length is attached by an amide bond [2]. The simplest sphingolipid is ceramide with a minimal hydrophilic region comprising two hydroxyl groups (see Fig. 1). Ceramide can be phosphorylated to ceramide 1-phosphate, glycosylated by glucosyl or galactosyl-ceramide synthases to generate glucosylceramide (GlcCer) or galactosylceramide, or can receive a phosphocholine headgroup (transferred from phosphatidylcholine) to form sphingomyelin [3]. Degradation of complex glycosphingolipids (GSLs) such as gangliosides can also lead to the formation of GlcCer through the sequential action of specific glycohydrolases.

Major advances in the elucidation of the metabolism and properties of sphingolipids during the last two decades have led to the conclusion that these lipids are not simply inert molecules but also bioactive effectors implicated in key cell functions such as differentiation, proliferation, motility, apoptosis, autophagy or senescence. Ceramide is particularly implicated in apoptosis [4]. Many agents that trigger apoptotic cell death cause an elevation of intracellular ceramide levels, *via* increased *de novo* synthesis, sphingomyelin breakdown or a combination of both pathways. These agents include physical stresses (e.g., heat shock, ionizing radiation, UV), cytokines (tumor necrosis factor-$\alpha$ (TNF), CD95 ligand, TRAIL, interleukin-1$\beta$, interferon-$\gamma$), anticancer drugs, hormones, cannabinoids, oxidized low density lipoprotein, nitric oxide, and various bacteria [5–7]. Ceramide also regulates several pathways governing cell cycle and senescence [8].

Of note, the cell responses to ceramide may be modulated by its metabolic transformation to sphingomyelin or its degradation to sphingosine by ceramidase and then the production of sphingosine 1-phosphate. The conversion of ceramide to GlcCer might also contribute to modulate the ceramide signal (see below).

## 2. Glucosylceramide: the backbone of numerous glycolipids

GSLs are sphingolipids composed of a ceramide backbone and a sugar headgroup, which both contribute to an impressive structural heterogeneity. A typical mammalian cell may contain thousands of different GSL molecular species [9]. Indeed, more than 60 different sphingoid bases (differing by their length, saturation, hydroxylation, or branching [10]) and more than 300 different oligosaccharide chains have been characterized [11]. GSLs are divided into two main categories: the glucosphingolipids and galactosphingolipids [12].

Glucosylceramide (GlcCer) occupies a central position in the

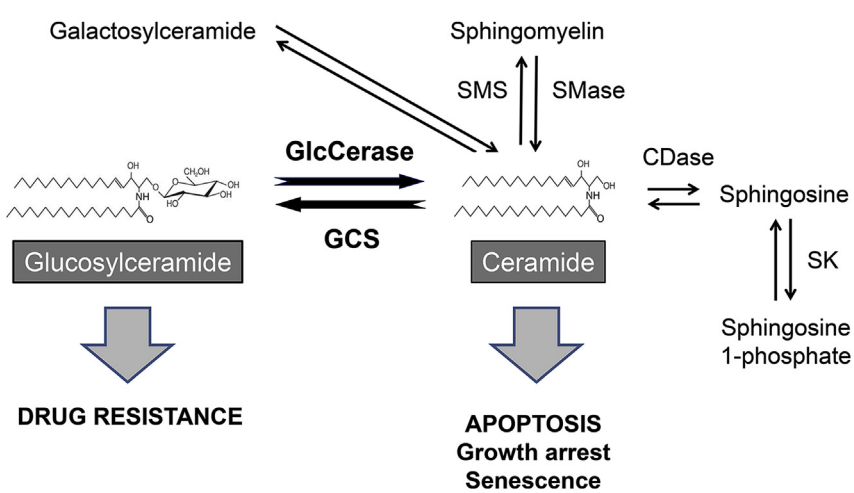


**Fig. 1.** Schematic view of glucosylceramide metabolism and biological functions in mammals. Abbreviations: CDase, ceramidase; GCS, glucosylceramide synthase; GlcCerase, glucosylceramidase (GBA1, GBA2, or GBA3); SK, sphingosine kinase; SMase, sphingomyelinase; SMS, sphingomyelin synthase.

Please cite this article in press as: L. Astudillo, et al., Glucosylceramidases and malignancies in mammals, Biochimie (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.11.009

metabolism of many GSLs. Indeed, ninety percent of mammalian GSLs are GlcCer-based [13]. GlcCer may be elongated with additional carbohydrate residues resulting into a large variety of complex sugar moieties and distinct GSL series, characterized by specific oligosaccharide motives. Therefore, GlcCer represents the core structure of many thousands of structurally different GSLs including gangliosides and higher sulfatides [14]. GlcCer is absolutely essential for the development of mammals. Indeed, in mice homozygous disruption of the *Ugcg* gene, which encodes GlcCer synthase, to eliminate the major pathway of GSL synthesis, results in embryonic lethality occurring at gastrulation, that seems to be related to enhanced apoptosis centered in the ectoderm [15].

Mammalian GlcCer differs structurally from GlcCer of plants, fungi, flies or worms by the structure of the ceramide backbone [16]. Mammalian GlcCer mainly contains sphingosine (d18:1), a sphingoid base with one double bond at the C4 position in a *trans* conformation, and an N-linked C16-24 fatty acid. The N-acyl chain distribution varies among tissues or cell types depending on the expression of six different ceramide synthases [17].

GlcCer is synthesized in the *cis/medial*-Golgi apparatus by the glycosylation of ceramide, a reaction catalyzed by GlcCer synthase (GCS, also known as UDP-glucose:ceramide glucosyltransferase) [18,19]. This enzyme uses UDP-glucose as a donor of the sugar and the ceramide that is preferentially transported from the endoplasmic reticulum (ER) to the cytosolic leaflet of the *cis*-Golgi by a still unclear, ceramide transport protein (CERT)-independent pathway [20,21]. Human GCS is encoded by *UGCG* mapped to 9q31 chromosomal region [22]. It is a transmembrane protein, composed of 38-kDa monomers organized as dimers or oligomers, that has its catalytic site facing the cytosol, where newly produced GlcCer can be recognized by the four-phosphate adaptor protein 2 (FAPP2) [23]. How is then GlcCer transported to the lumen of the Golgi for further glycosylation and how FAPP2 precisely controls GSL biosynthesis, is still a matter of debate [24,25]. Also, whether cytosolic and lumenal membrane pools of GlcCer play distinct functions is unclear. For instance, van Meer and coworkers have proposed that, in pigment cells GlcCer is required for the formation of a functional protein coat on the cytosolic surface of the vesicles that bud from the trans-Golgi network to transport newly synthesized enzymes to melanosomes, where synthesis of melanin occurs [26]. They further suggested that GlcCer (or glycolipids) can lower lumenal pH by stimulating the proton pump, and, as a result, be involved in protein sorting and melanosome biogenesis [27].

Newly synthesized complex GSLs are then transported to the outer leaflet of plasma membranes by vesicular exocytosis. Following endocytosis or phagocytosis, they reach the endosomes-lysosomes where their catabolism predominantly takes place by stepwise removal of the oligosaccharide moiety [28]. With regard to GlcCer, its degradation occurs in the lysosomes by a specific glucosylceramidase, but can also be catalyzed in other compartments by non-lysosomal glucosylceramidases.

## 3. Glucosylceramidases

In mammalian cells, GlcCer can be degraded to glucose and ceramide by three distinct hydrolases: the lysosomal GBA1 and the non-lysosomal GBA2 and GBA3 enzymes (Table 1). A fourth enzyme, the lactase-phlorizin hydrolase (EC 3.2.1.62/108), which is expressed in the small intestine, will not be discussed here as its *in vivo* ability to hydrolyse dietary GlcCer has not been convincingly documented [29].

### 3.1. Lysosomal glucosylceramidase

#### 3.1.1. Enzyme structure and properties

Acid β-glucosidase or glucosylceramidase (GlcCerase; D-glucosyl-N-acylsphingosine glucohydrolase; glucocerebrosidase; EC 3.2.1.45) is a peripheral membrane protein that hydrolyses the β-glucosidic linkage of GlcCer in lysosomes but also some synthetic β-glucosides [30]. It requires saposin C and negatively charged phospholipids for optimal hydrolytic activity against GlcCer [31]. It is a member of the glycoside hydrolase family 30 [32]. Quite intriguingly, it could also catalyze the formation of cholesteryl-β-glucoside [33].

GlcCerase is encoded by the *GBA1* gene, located at 1q21 and which comprises 11 exons [34–36]. Like other lysosomal proteins, GlcCerase is synthesized on ER-bound polyribosomes; it enters the ER through the signal recognition particle, accompanied by leader peptide cleavage and N-linked glycosylation on four asparagine residues (N58, N98, N185 and N309) [37]. When correctly folded, the enzyme is transported to the Golgi network and then targeted to the lysosomes by a non-canonical (mannose 6-phosphate receptor-independent) pathway that is mediated by the binding to the lysosomal integral membrane protein LIMP-2 [38]. Such a binding already occurs in the ER. In the more acidic prelysosomal compartments (late endosomes), GlcCerase dissociates from LIMP-2 and becomes membrane associated in the lysosome [38]. However, this sorting mechanism has been challenged: lysosomal targeting of GlcCerase may indirectly involve the cation-independent mannose 6-phosphate receptor, that would bind GlcCerase and LIMP-2 to form a heterotrimeric complex [39]. Very recently, novel observations on mouse liver lysosomes and embryonic fibroblasts have been published that argue against a mannose 6-phosphate-

**Table 1**
Main characteristics of mammalian glucosylceramidases.

| Enzyme | | Gene | | Protein | | | Enzyme properties | | Human gene defect |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Name | Synonyms, alternative names | Name | Chromosomal location | Length (AA) | Tissue distribution | Subcellular localization | Substrates | Optimum pH | |
| Acid β-glucosylceramidase | Acid β-glucosidase; Acid β-glucocerebrosidase | *GBA1* | 1q21 | 536 | Ubiquitous | Lysosomal membrane | GlcCer; glucosylsphingosine | 4–5 | Gaucher disease |
| Non-lysosomal β-glucosylceramidase | Bile acid β-glucosidase; β-glucosylceramidase 2 | *GBA2* | 9p13 | 927 | Brain, heart, skeletal muscle, kidney and placenta | ER, Golgi, plasma membrane | Bile acid conjugates; GlcCer | 5.5–6.5 | Inherited cerebellar ataxia and spastic paraplegia |
| Cytosolic β-glucosidase | Klotho-related protein; KLrP | *GBA3* | 4p15 | 469 | Liver, small intestine, spleen, kidney | Cytosol | Flavonoid glycosides; C6-NBD-GlcCer | 6–7 | nd |

Abbreviations: AA, amino acids; ER, endoplasmic reticulum; C6-NBD-GlcCer, 6-[N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl-glucosylsphingosine; nd, not described.

Please cite this article in press as: L. Astudillo, et al., Glucosylceramidases and malignancies in mammals, Biochimie (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.11.009

dependent lysosomal sorting of LIMP-2 and GlcCerase [40].

Mature GlcCerase contains 497 amino acids with five N-glycosylation sites. Indeed, glycosylation is required to form catalytically active conformer and the occupancy of the first N-glycosylation site is essential to the activity [41]. Analysis of its crystal structure has allowed a better understanding of GlcCerase function [42–44]. The enzyme contains three non-contiguous domains, the catalytic site being located in domain III, a TIM barrel. Site-directed mutagenesis and modeling experiments suggest (or confirm) that residue E235 is the catalytic acid/base (proton donor) and E340 the nucleophile [42–46]. GlcCerase proceeds by a two-step catalytic mechanism. First, a nucleophile residue attacks the O-glycosidic anomeric linkage at C1; this is followed by protonic donation from acid/base catalyst to the ceramide-glucosidic bond. Ceramide is then released and the enzyme–glucosyl complex is formed. Data based on crystal structures of GlcCerase bound to N-alkyl-deoxynojirimycins (see below) suggest two possibilities in the first step [47]. Whereas the commonly accepted view is that the nucleophilic attack on the anomeric carbon is direct, an alternative mechanism suggests that, because of steric hindrance, the hydrolysis of the glycosidic bond must proceed through a carbenium ion intermediate [47]. The deglucosylation step involves the addition of water to the enzyme–glucosyl complex in a base-catalyzed process assisted by an acid/base catalyst to release β-glucose while regenerating the acid of the acid/base and the nucleophile. The cavity for the water molecule seems to reside near the catalytic residue E235, a location equivalent to that found in other glycosidases.

GlcCerase can be inhibited by irreversible inhibitors, including conduritol B-epoxide (1,2-anhydro-myo-inositol), cyclophellitol and conduritol B aziridine [48,49]. Conduritol B-epoxide has been used both to understand the structure of the enzyme active site (it covalently binds to E340) and to mimick Gaucher disease (GD) by inducing GlcCer storage in cultured macrophages, bone marrow mesenchymal stem cells or animals [44,50–53]. GlcCerase can also be inhibited by competitive inhibitors such as polyhydroxypiperidine alkaloids deoxynojirimycin (DNJ), some N-alkylated DNJ analogues, and castanospermine, isofagomine analogues, and aminocyclitols (such as β-valienamine, β-validamine and N-alkyl derivatives of β-valienamine) [54].

### 3.1.2. Inherited defects affecting lysosomal glucosylceramidase

Deficient activity of GlcCerase is responsible for GD, the most prevalent lysosomal disease [55]. It is an inborn lipid storage disorder, with autosomal recessive inheritance. GD is characterized by storage of GlcCer in cells of the reticulo-endothelial system of the liver, spleen and bone marrow (so-called Gaucher cells). GD has been divided into three different clinical subtypes. The most common form representing 95% of GD is the adult chronic non-neuronopathic type 1 disease (MIM# 230800) with onset in childhood or adulthood, characterized by hepatosplenomegaly, anemia, thrombocytopenia, and bone lesions. The most severe form is the infantile, acute neuronopathic type 2 disease (MIM# 230900), with severe visceral and neurological involvement in early infancy and death by early childhood. The third form is the juvenile subacute neuronopathic type 3 (MIM# 231000) characterized by central nervous system involvement in adulthood [56].

GD results from pathogenic *GBA1* mutations. About 350 different mutations have been reported to date, most of them (75%) being missense mutations [57]. Some GBA1 mutations are prevalent. The very common so-called N370S mutation (c.1226A > G, p.Asn409Ser) is found in the Ashkenazi Jewish population and is associated exclusively with type 1 disease [58]. The most common mutation among the non-Jewish population is the so-called L444P mutation (c.1448T > C, p.Leu483Pro), that predisposes to the development of the neuronopathic form when in homozygosity [59]. Homozygosity for the D409H mutation (c.1342G > C, p.Asp448His) is associated with valvular heart disease, oculomotor apraxia but no visceral involvement [60]. Some GBA1 mutations result in a misfolded GlcCerase enzyme, which becomes retained in the ER and not efficiently transported to the lysosome [57]. It is thus retrotranslocated to the cytoplasm, and undergoes polyubiquitination and proteosomal degradation. The degree of its ER-associated degradation correlates with the GD severity [61]. Despite much progress in knowledge of the GlcCerase and Saposin C (see below) structures, the impact of some GBA1 mutations on enzyme (dys)function remains to be explained. Nevertheless, the genotype of GD can partially provide guidance as to the nature of disease progression, and to prognostic significance for families [56]. GD is rare with an overall frequency of about one in 50 000 live births in a predominantly White population of European origin, but frequent in Ashkenazi Jews where the frequency reaches one in 800 live births [56,62].

Different animal models of GD have been developed to study GD (for a review, see Ref. [63]). These include a chemically-induced mouse model, *Gba1*-knockout ($Gba^{-/-}$) mice, and mouse models harboring *Gba1* point mutations. Conditional GD mice have also been developed, to restrict the *Gba1* disruption to hematopoietic and endothelial cells, or to the central nervous system. A fish (medaka) model, resembling human neuronopathic GD with progressive neuronal loss and microgliosis, has just been reported [64].

Currently, treatment of GD is based on enzyme replacement therapy (ERT). This treatment is based on the systemic injection of an active GlcCerase, initially purified from human placenta, nowadays recombinant (produced in mammalian or plant cells). ERT is very efficient on the visceral manifestations of the disease: it improves cytopenia, reduces liver and spleen enlargement and bone lesions. A second therapeutic option is a substrate reduction therapy using orally-administered drugs (miglustat or eliglustat tartrate) that decrease the biosynthesis of GlcCer through inhibition of GCS [65,66]. An advantage of these drugs is their ability to penetrate the central nervous system. Further options for the treatment of GD include pharmacological chaperone therapy (for selected GBA1 mutants) and gene therapy.

A variant GD phenotype may also result very rarely from mutations of the prosaposin gene, *PSAP* [67,68] (MIM#610539). This gene encodes a precursor protein the proteolytic cleavage of which releases Saposin C, a key activator of lysosomal GlcCerase [69]. Saposin C allows a reversible and pH-dependent interaction of the enzyme with the GlcCer substrate embedded in vesicles containing anionic phospholipids [70,71]. How exactly the sphingolipid is transferred from Saposin C to GlcCerase is still unclear. In one hypothesis (solubilizer model), Saposin C extracts the lipid from the bilayer in a soluble complex and then dissociates from the membrane to form a complex with GlcCerase. According to the second hypothesis (liftase model), Saposin C remains bound to the membrane and forms a complex with GlcCerase which cleaves the exposed GlcCer headgroup [69].

Genetic defects in LIMP-2 (*SCARB2* gene) are not responsible for a GD phenotype but a severe autosomal recessive disorder known as action myoclonus-renal failure syndrome (MIM# 254900) [72]. It associates progressive myoclonic epilepsy with storage material in the brain, and focal glomerulosclerosis with reduced GlcCerase activity in fibroblasts [73]. LIMP-2 could serve as a modifier in GD [74].

Recently, GlcCerase deficiency has also been implicated in Parkinson disease (PD), a common neurodegenerative condition characterized by resting tremor, akinesia, rigidity, and postural instability, caused by selective degeneration of dopaminergic neurons within the substantia nigra pars compacta. An international multicenter study analysed the genotype and phenotype of

more than 5000 patients with PD, and found an odds ratio of 5.43 for any GBA1 mutation, in PD patients *versus* controls [75]. It is now accepted, from the results of several international studies, that a GBA1 mutation is the highest risk factor for the development of PD. Analysis of brains from patients with GBA1-associated parkinsonism has shown numerous synuclein-positive inclusions, similar to brainstem-type Lewy bodies found in PD. Lewy bodies are round eosinophilic inclusions in neuronal perikarya, resulting from abnormal processing and accumulation of α-synuclein, a small presynaptic protein found in both soluble and membrane-associated fractions of the brain. The abnormal accumulation of α-synuclein insoluble aggregates in neurons or glial cells defines the α-synucleinopathies comprising PD, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy. What is the pathophysiological link between GlcCerase and α-synuclein metabolism? Hypotheses include a gain of toxic function due to GBA1 mutations that would promote α-synuclein aggregation, and an enzyme loss-of-function with GlcCer accumulation affecting α-synuclein processing and clearance, which would in turn inhibit the activity of GlcCerase [76,77].

### 3.2. Bile acid β-glucosidase (non-lysosomal glucosylceramidase)

Bile acid β-glucosidase, also known as GBA2 (EC 3.2.1.45), is a non-lysosomal β-glucosidase. The absence of accumulation of GlcCer in most of other cell types than macrophages in GD, despite a severe deficiency of lysosomal GlcCerase, had suggested an alternative pathway of catabolism. Indeed, a distinct β-glucosidase also active towards GlcCer could be demonstrated in GD cells [78]. Subcellular fractionation analysis revealed that this enzyme is not located in lysosomes but at the cytosolic surface of the ER and/or Golgi [79,80]. In the model of GlcCer transport by FAPP2 to the ER, where GlcCer is then flipped to the ER lumen, GBA2 would be close to the site of GlcCer formation and may control GlcCer availability for complex GSL synthesis.

GBA2 was initially purified and characterized from human liver. Bile acid 3-O-glucosides synthesized in human liver microsomes were the only natural substrates suspected for GBA2, which was thus named bile acid β-glucosidase [81]. The protein which contains 927 amino acids [82] is encoded by the *GBA2* gene located on chromosome 9p13.3. The optimum pH of the enzyme ranges between 5.0 and 6.4 (Table 1). The enzyme is activated by divalent metal ions, and requires phospholipids for optimal activity. In humans, GBA2 is ubiquitous and mRNA is mainly expressed in brain, heart, skeletal muscle, kidney, and placenta; minor levels are found in liver, spleen, small intestine, lung, and very low levels in colon (without mucosa), thymus and peripheral blood leukocytes [82]. In mice, Gba2 mRNA is present ubiquitously, with high levels in testis, brain and liver [9]. Gba2-deficient mice do not exhibit any abnormal bile acid metabolism (questionning the role of the enzyme towards bile acids) but accumulate GlcCer in the testes, which may explain the observed male infertility [9]. Indeed, microscopic analysis of sperm cells reveals large round heads (globozoospermia), abnormal acrosomes, and defective mobility [9]. GlcCer also accumulates in the brain and liver of these knockout mice but without neurological symptoms, organomegaly, or reduction in lifespan [9]. The same Gba2-deficient mice exhibit a transiently delayed liver regeneration after two-third partial hepatectomy, associated with decreased serum levels of IL-6 and TNF and reduced activation of STAT-3 [83]. These findings led to the suggestion that GBA2 (and possibly its GlcCer substrate) regulates growth factor signalling during liver regeneration [83].

At variance with previous statements, GBA2 can be time-dependently inhibited by conduritol B-epoxide (the GBA1 inhibitor) [84]. It can also be potently inhibited by iminosugars such as N-butyldeoxygalactonojirimycin [84] and some adamantane hydrophobic derivatives [85,86].

Mutations in the *GBA2* gene have recently been identified in patients with hereditary spastic paraplegia (pyramidal motor neuron dysfunction, mental impairment, cataract, hypogonadism in males associated with various degrees of corpus callosum and cerebellar atrophy) as well as in cases of autosomal-recessive cerebellar ataxia with spasticity [87–89]. This is consistent with the implication of GBA2 in central nervous system development as also indicated by the abnormalities in motor behavior and axonal outgrowth of motoneurons in GBA2-knockdown zebrafish [87,90].

### 3.3. Klotho-related protein (GBA3)

Human cytosolic β-glucosidase, also known as Klotho-related protein (KLrP, GBA3, EC. 3.2.1.21) is an enzyme belonging to the glycoside hydrolase family 1 that is able to hydrolyse a wide variety of substrates with a β-D-glucose (or another sugar) moiety linked to a hydrophobic group [91,92]. It is a soluble protein present in the kidney, liver, spleen, intestine and lymphocytes of mammals. Its optimum pH is around 6.5. In humans, the enzyme has significant activity towards many common dietary xenobiotics including glycosides of phytoestrogens, flavonoids, simple phenolics and cyanogens [93], suggesting a role in xenobiotics metabolism. KLrP is also capable of degrading artificial substrates such as C6-NBD-GlcCer (but also C6-NBD-GalCer) in the presence of conduritol B-epoxide at neutral pH. KLrP should thus be defined as a β-glycosylceramidase rather than a β-glucosylceramidase [94]. Natural GlcCer appears to be a substrate for GBA3 as demonstrated by elevation of GlcCer levels in GBA3-silenced (by siRNA) cells [94]. However, this notion has recently been challenged [95]. Not only the intracellular GlcCer content remained unchanged after treatment of cells with a new inhibitor specific for GBA3, but also a common truncation of the *GBA3* gene had no impact on the severity of patients with GD. The X-ray structure of KLrP and site-directed mutagenesis revealed that, quite similarly to GBA1, KLrP contains a (β/α)8 TIM barrel in which E165 and E373 could function as an acid/base catalyst and a nucleophile, respectively [94].

## 4. Glucosylceramide synthesis and cancer

Pioneering studies by Cabot and coworkers demonstrated increased cellular levels of GlcCer in several multidrug resistant (MDR) cell lines (including breast cancer MCF-7-AdrR, vinblastine-resistant epidermoid carcinoma KB-V-1, and ovarian adenocarcinoma NIH:OVCAR-3 cells) [96]. An alteration of GlcCer metabolism was suggested, in particular an accelerated GlcCer synthesis, because the rate of GlcCer breakdown in these experiments was not attenuated. A comparable increase in GlcCer content was also documented in human tumor specimens [97]. Drugs such as tamoxifen, verapamil, or cyclosporin A, which can reverse the MDR phenotype, markedly decrease GlcCer levels. Similarly to the action of PPMP (1-phenyl-2-palmitoylamino-3-morpholino-1-propanol), a pharmacological inhibitor of GCS, inhibition of GlcCer synthesis by tamoxifen is correlated with its ability to resensitize MDR cells to chemotherapy [98]. Remarkably, overexpression of GCS in wild-type MCF-7 breast cancer cells resulted in strong resistance to adriamycin and ceramide, as compared to unmodified cells [99]. GCS overexpression in several cancer and leukemia cell lines could confer resistance to doxorubicin, TNF, daunorubicin, or C6-ceramide [99–102]. Reciprocally, GCS expression in various cancer cell lines displaying a MDR phenotype was 2–4-fold higher than in their sensitive counterparts [103,104]. Also, reduction of GCS expression by siRNA or antisense oligonucleotides, or pharmacological inhibition of GCS could restore sensitivity of resistant

Please cite this article in press as: L. Astudillo, et al., Glucosylceramidases and malignancies in mammals, Biochimie (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.11.009

cancer cells to several anticancer agents [105,106].

*In vivo* tumorigenesis experiments have supported the concept for a beneficial role of GCS attenuation. Indeed, pretreatment of melanoma cells with distinct GCS inhibitors did not affect their viability or proliferation rate *in vitro* but reduced or delayed tumor formation [106]. Similar results were obtained after implantation of melanoma cells that are genetically-deficient for GCS, or after oral administration of the GCS iminosugar inhibitor OGT2378 to tumor-bearing mice [107]. These effects were attributed to the depletion of (immunosuppressive) gangliosides both in the tumor and the host tissues. A model of MDR tumor xenografts, generated by the inoculation of NCI/ADR-RES cells into athymic mice, also showed that silencing GCS can lead to reduced tumor growth and increased sensitivity of these tumors to doxorubicin [108]. However, this GCS-associated drug resistance may be cell type-dependent since the sensitivity of some other cell lines to doxorubicin or CD95 remained unaffected upon changes in GCS expression [109,110].

Moreover, clinical observations correlate with *in vitro* studies. In patients, the increased expression of GCS seems to be an indicator of poor prognosis in breast, urinary, lung or ovarian cancers and leukemia [111,112]. In breast cancer, analysis of microarray data in a cohort of 1681 tumors showed that GCS expression was associated with a positive estrogen receptor status, lower histological grading, low Ki67 levels and ErbB2 negativity [113]. Another study reported that GCS is overexpressed in metastatic as compared with non-metastatic breast cancer, and in estrogen receptor-positive breast tumors [111]. GCS expression also correlated with HER2 in estrogen receptor-negative breast cancers. In another recent study of 196 cases of invasive ductal breast cancer, GCS expression correlated with high estrogen receptor and low HER-2 status [114]. In bladder cancer (75 samples), a high GCS expression, assessed by immunohistochemistry, was associated with lymph node invasion, reduced mean overall 5-year survival and reduced mean disease-free survival times [112]. In patients with lung cancer, GCS expression was significantly up-regulated in non-small cell lung cancer and associated with poor differentiation, lymph node or distant metastasis, and chemotherapy resistance [115]. In 65 leukemia patients, an up-regulation of GCS as well as MDR1 and Bcl-2 (as detected by RT-PCR) was observed in the drug-resistant group compared with the drug-sensitive group [116]. A further example is renal cell cancer in which transcriptional profiling identified GCS among a subset of overexpressed genes defining a “metastatic signature” [117].

How GCS and/or GlcCer modulate drug resistance is not well understood. Agents that elevate endogenous ceramide levels or short-chain ceramides are able to increase GCS mRNA and enzyme activity [118,119]. Moreover, chemotherapy (doxorubicin) is able to promote GCS expression *via* the Sp1 transcription factor [120,121]. Overexpression of P-glycoprotein (P-gp), the ABCB1 transporter encoded by *MDR1*, confers resistance to multiple drugs such as Vinca alkaloids, anthracyclines, epipodophyllotoxins and taxol [122]. P-gp is a transmembrane protein, expressed physiologically in various tissues, that functions as an energy-dependent pump to efflux a variety of structurally unrelated hydrophobic cytotoxic molecules [123]. Short chain-ceramide (C8-ceramide) or short-chain GlcCer (C8-GlcCer) are able to increase MDR1 transcript levels and P-gp expression [123]. However, coadministration of a GCS inhibitor and short-chain ceramide can block MDR1 up-regulation, suggesting that GlcCer could participate in this up-regulation [124]. Several cancer cell lines exhibited a parallel increase of GlcCer levels, GCS mRNA, GCS protein, P-gp and drug resistance [108]. In addition, silencing GCS could repress MDR1 expression and sensitize drug-resistant cancer cells. Conversely, ectopic expression of GCS in an ovarian cell line (OVCAR-8) with low levels of GCS and P-gp, resulted in an up-regulation of MDR1 expression and an enhancement of P-gp efflux activity through a cSrc and β-catenin signalling pathway [108]. Mechanistically, these events were linked to a GCS-mediated increase in globo series GSLs (such as Gb3 and Gb4) in membrane glycolipid-enriched microdomains leading to cSrc activation, increase in nuclear β-catenin and (possibly by binding of the Tcf4 transcription factor) subsequent activation of the MDR1 promoter.

## 5. Glucosylceramide breakdown and cancer

Expression of the *GBA(1–3)* genes has been examined in multiple malignancies; however, no uniform or unequivocal picture has yet emerged from these transcriptomic analyses (see Supplemental Table). For instance, while there is a general down-regulation of all three GlcCerases in colorectal cancers, GBA1 is rather overexpressed and GBA2 underexpressed in breast cancer. Expression levels of GBA1 and GBA3 are low in leukemia and kidney carcinomas, respectively. Nevertheless, as discussed below, significant observations point to a link between GlcCerases, GlcCer and cancer. Most of our knowledge focuses on GBA1.

### 5.1. Lysosomal glucosylceramidase and cancer

#### 5.1.1. Malignancies in gaucher disease

Multiple reports have highlighted the association between cancer and inherited GBA1 deficiency. Indeed, the occurrence of hematologic disorders and particularly B-cell or plasma cell malignancy as multiple myeloma (MM), acute or chronic leukemia, Hodgkin's disease in GD was first reported in case reports and small case-series [125–130]. In 1982, a causative link between accumulation of GlcCer and cancer was postulated. Lee et al. found several tumors in 239 GD patients [131]. Polyclonal gammopathy with hypergammaglobulinemia as well as monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS, a pre-malignancy condition predisposing to MM) were observed in GD patients, in 41% and 19% respectively [132,133]. Enzyme substitution (ERT) might actually be beneficial on the occurrence and severity of gammopathies in GD patients [133,134].

The risk of malignancies in GD patients compared with a control population has been investigated in six cohorts (see Table 2). The first study in 1993 showed an increased risk of cancer of 3.6 and a 14.7 fold risk of having hematologic cancer [135]. Rosenbloom et al. studied the incidence of malignancy in 2742 GD patients from the International Gaucher Registry and found a relative risk of 5.9 for MM and no increase of other cancers [136]. However, the age of patients in this cohort was less than 55 years for 84.8% of patients. Zimran et al. studied the diagnosis of cancer in 505 patients with type 1 GD from a single clinic [137]. Four percent of patients developed a cancer (mainly lymphoma, myelodysplastic syndrome and MM) with no statistically significant difference with the control population [137]. In a Western Europe population of 131 GD patients, de Fost et al. found 14 cancers [138]. Compared to the general population, they found an increased risk of 2.5 for all types of cancer, and of 51.1 in particular for MM [138]. There was also a statistically significant risk for hepatocellular carcinoma, even in the absence of preexisting cirrhosis [138]. MGUS was also increased at 11.4% of the population with a prevalence estimated to 1–2% in the normal population. No difference in disease activity, spleen status, or GD genotype in patients with or without cancer was found [138]. The study by Landgren et al., on 1525 GD patients among male US veterans revealed an elevated risk for non-Hodgkin lymphoma, malignant melanoma and pancreatic cancer [139]. However, the validity of these results gave rise to discussion because of the methodology used: GD patients were defined using the International Classification of Diseases (ICD-8 and ICD-9CM)

Please cite this article in press as: L. Astudillo, et al., Glucosylceramidases and malignancies in mammals, Biochimie (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.11.009

**Table 2**
Increased risk of malignancies in patients affected with Gaucher disease.

| | Shiran et al., 1993 [135] | Rosenbloom et al., 2005 [136] | Zimran et al., 2005 [137] | de Fost et al., 2006 [138] | Landgren et al., 2007 [139] | Taddei et al., 2009 [141] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of GD patients | 48 | 2742 | 505 | 131 | 1525 | 403 |
| Type of GD | 1 (100%) | 1 (91.5%)<br>2 (1.0%)<br>3 (5.3%) | 1 (100%) | 1 (100%) | ND | 1 (100%) |
| Origin/Ethnicity of GD patients | Ashkenazi Jewish | Caucasian, non-Jewish (22.7%)<br>Ashkenazi Jewish (23.2%)<br>Unreported (39.8%)<br>Others (14.3%) | Mostly Ashkenazi Jewish | Netherlands (48%)<br>Germany (52%) | African American male veterans (88.3%)<br>White male veterans (11.7%) | Ashkenazi Jewish (84.6%) |
| Age of GD patients at presentation (years) | 20 to 80 | 0-14 (25.6%)<br>15-44 (47%)<br>45-54 (12.2%)<br>55-64 (7.5%)<br>>65 (7.7%) | males: 38.7<br>females: 37.0 | 48.5 | White Americans: 49.7<br>African Americans: 46.0 | 38.9 |
| Proportion of GD patients under ERT | 0 | 81.7% | ND | ND | ND | 71% |
| Control population | A community from the same region of residence | US population | Entire putatively Ashkenazi Jewish Israeli population | Dutch population | African American male veterans (n = 832 115)<br>White male veterans (n = 3 667 637) | US population |
| Overall relative risk for cancer (in brackets, 95% confidence intervals) | 3.6 [1.7–7.5] | 0.79 [0.67–0.94] | Males: 0.6 [0.12–1.1]<br>Females: 1.4 [0.7–2.2] | 2.5 [1.1–4.7] | 0.91 [0.76–1.08] | 1.80 [1.32–2.40] |
| Relative risk for the indicated malignancy (in brackets, 95% confidence intervals) | Hematologic cancers: 14.7 [5.2–41.7] | Myeloma: 5.9 [2.82–10.82]<br>Hematologic cancers: 1.23 [0.73–1.90] | ND | Hematologic cancers: 12.7 [2.6–37.0]<br>Myeloma: 51.1 [6.2–184]<br>Hepatocellular carcinoma: 141.3 [17.1–510.5] | Non-Hodgkin lymphoma: 2.54 [1.32–4.88]<br>Melanoma: 3.07 [1.28–7.38]<br>Pancreatic cancer: 2.37 [1.13–4.98] | Myeloma: 25 [9.17–54.40]<br>Other hematologic cancers: 3.45 [1.49–6.79]<br>Breast cancer: 1.84 [0.84–3.49]<br>Melanoma: 2.26 [0.62–5.79]<br>Others: 1.54 [0.77–2.75] |

Abbreviations: ERT, enzyme replacement therapy; GD, Gaucher disease; ND, not described.

with code 272.7 and 272.2 including lipid storage disorders other than GD (e.g., Niemann-Pick and Fabry diseases) [140]. In the cohort study investigated by Taddei et al. in a predominantly Ashkenazi Jewish population of 367 GD patients, 54% of them being homozygous for the N370S mutation, the overall lifetime risk of developing cancer was increased (relative risk, 1.8) as was the risk of developing hematologic malignancies, and in particular MM [141]. There was also an increased risk of breast cancer and melanoma [141]. A recent analysis of the pooled results from three single-centre cohort studies yielded a relative risk of cancer of 1.7 (95% confidence interval 1.27–2.31), and an estimated relative risk between 25.0 and 51.1 for MM and between 3.5 and 12.7 for other hematological malignancies [142]. This overview also emphasized the occurrence of other neoplasms in GD patients, including breast, colon, lung, renal cell and pancreatic carcinoma, melanoma, prostate cancer, basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, thyroid cancer, glioblastoma, and sarcoma [142]. Whether the currently used therapies for GD reduce the occurrence of malignancies is unknown.

An important variability of disease severity is often seen in GD patients, even among affected siblings harboring the same GBA1 genotype (Goker-Alpan, Hruska et al., 2005). Recently, some genes have been proposed as modifiers in GD [143–147]. These genetic modifiers may also participate in the emergence of cancers in GD.

#### 5.1.2. *Underlying causes of malignancies in gaucher disease*

The pathophysiology of cancer development in GD is not well understood. Two types of mechanisms might operate, both of them relating to the GlcCerase deficiency and the ensuing catabolic defect, i.e., the accumulation of GlcCer and/or its deacylated product, glucosylsphingosine. The first, most commonly evoked hypothesis is that the (perturbed) microenvironment in GD is responsible for tumorigenesis. The second tenet considers that initial steps are favored, not in the environment, but in the (future) malignant cell *per se*. So far, no study has carefully evaluated these hypotheses in cellular or animal models in the field of cancer. What do we currently know?

- Alterations of the microenvironment

Frequently observed in GD is a general picture of immune dysregulation, which may play an important role in cancer/GD [148]. Indeed, the catabolism of macromolecules in lysosomes is crucial for the correct function of the immune system, as shown by the immune alterations in various lysosomal storage disorders [149]. Several players in the microenvironment could be implicated, such as cytokines, CD8-positive T cells, regulatory CD4-positive T cells, natural killer (NK) and NKT cells, tumor-associated macrophages, dendritic cells, and also myeloid-derived suppressor cells. In GD patients, elevated levels of some cytokines and chemokines have been reported including IL-1β, interleukin-1 receptor antagonist, IL-6, IL-8, IL-10, IL18, TNF, M-CSF, and pulmonary and activation-regulated chemokine (PARC orCCL-18) [133,150–155]. However, these and additional cytokines and chemokines may be normal or even not detectable in some patients [133,152,154,155]. The source of these factors is most likely the so-called Gaucher cells, which are

alternatively activated (rather M2) macrophages that express CD68, CD36, SIRPα, CCL18, chitotriosidase and show an heterogeneous expression of CD163, IL-6, IL1-receptor antagonist; of note, they do not express mannose receptors, TNF or MCP1 (also named CCL2) [156]. The enhanced release of cytokines by Gaucher cells has been postulated to play a key role in the high frequency of gammopathies and MM in GD [154].

GD patients also exhibit an abnormal response of T lymphocytes and a decrease of NK cells [155,157]. γδ2 T lymphocytes are also reduced but with normal production of IFNγ after stimulation [155]. Moreover, GD patients display an important increase in memory CD4+ T cells and a decrease in the number of peripheral blood dendritic cells (both myeloid and plasmocytoid) [155,158]. A reduction in the frequency of IFNα-producing plasmocytoid dendritic cells upon TLR9 triggering has also been described in GD patients; this abnormality was restored after enzyme therapy [155]. Nevertheless, monocyte-derived dendritic cells from GD patients in culture did not exhibit phenotypic or functional defects [158].

Invariant natural killer T (iNKT) cells, which participate to the anticancer immunosurveillance, could also be implicated. The iNKT population represents a subset of αβ T cells, with invariant TCR alpha chain, that recognize lipid antigens bound to the non-polymorphic CD1d molecule. Several natural GSLs, such as α-galactosylceramide, isoglobotrihexosylceramide (iGb3), and glycolipid antigens from some bacteria, have been identified as potential antigens for iNKT cells. Recently, it was shown that endogenous GlcCer provides a major TCR signal for murine and human iNKT cells [159] (though the observed effects might be due to some contamination by α-GlcCer [160]). Through reduced synthesis of GlcCer, GCS silencing resulted in less self-reactivity and lower response of iNKT cells to bone-marrow-derived-dendritic cells in the presence of lipopolysaccharide or whole bacteria. On the other hand, silencing the transferase that converts GlcCer to lactosylceramide did the opposite. Elsewhere, a very recent study identified a distinct subset of type II NKT cells of the T-follicular helper phenotype, that recognize GlcCer [161]. Injection of GlcCer to mice led to an increase of these CD1d-restricted cells associated with an induction of germinal center B-cells and hypergammaglobulinemia. Whereas GlcCer may play an important role for some NKT functions, nothing is known about a possible relationship with increased incidence of malignancies in GD.

Moreover, CD1d molecules are dysregulated in GD. Indeed, monocytes from GD patients show an up-regulation of CD1d and MHC-class II [162]. Treatment of blood mononuclear cells from healthy donors or a monocytic (THP-1) cell line with conduritol B-epoxide also showed an up-regulation of CD1d [162]. A similar finding was noted using THP-1 cells differentiated into macrophages by retinoic acid and treated with the GBA1 inhibitor. THP-1 cells with high CD1d expression were more stimulatory for CD4+ T cells than CD8+ T cells in coculture, suggesting a possible link between lipid storage, expression of CD1d and MHC-class II by monocytes and chronic activation of CD4+ T cells [163]. The low numbers of peripheral blood CD4+ T cells seen in GD patients might be explained by a progressive exhaustion and loss of CD4+ T cells secondary to their chronic activation. The immune dysregulation seen in GD could also be related to the affected bone marrow mesenchymal stromal cells. Such cells isolated from a GD patient (carrying the N370S/L444P mutations) showed an increased GlcCer level and production of IL-8, MCP1 and prostaglandin E2 [52]. Normal human mesenchymal stromal cells treated with conduritol B-epoxide also showed an up-regulation of genes involved in proteolysis, lipid homeostasis, and the inflammatory response (such as MCP1).

In accordance with observations in GD patients or *in vitro* models, animal GD models also exhibit immune dysfunction. Mice homozygous for the L444P mutation show a multi-organ system inflammation in liver, spleen and lung (along with elevated TNF and IL-1β mRNA levels) with no overt GlcCer accumulation [164]. In another model of GD (D409V/null), the increased number of macrophages and dendritic cells in liver, spleen and lung was associated with an increase of stimulatory and costimulatory molecules (CD40, CD80, CD86, MHC-II) [165]. Activated CD4+ T cells were also elevated in liver, spleen and lung but not in the bone marrow. In this model, serum cytokines, including IFNγ, IL-12p40, TNF, IL-17A/F, IL-6, and TGF-β, were increased. Mononuclear cells from liver, spleen and lung were stimulated with CD3/CD28 enhancing Th1 and Th17 cytokines [165]. Polymorphonuclear cells were also increased in liver, spleen and bone marrow, probably due to increased IL-17, and CXCL1 and CXCL2 chemokines. Genome-wide transcriptome analysis of this mouse model evidenced an altered expression of genes implicated in macrophage activation and immune response. Both IFNγ-regulated proinflammatory and IL-4-regulated anti-inflammatory pathways appeared to be involved in differential disease progression [166]. The extent of tissue GlcCer accumulation correlated with changes in gene expression. The increased inflammation seen in GD may also relate to a reduced IL-10 release as observed in L444P/L444P mouse macrophages [167]. Likewise, conditional Gba1 inactivation in hematopoietic and mesenchymal stem cells resulted in a profound and organ-specific dysfunction of immune cells affecting mainly the thymus with impaired T-cell maturation, aberrant B-cell recruitment, enhanced antigen presentation, and impaired egress of mature thymocytes [168]. In an inducible model of murine GD, there was an increased incidence of diffuse large B-cell lymphoma and monoclonal gammopathy as compared to control mice [169]. However, lymphoproliferative disease is rather common in ageing mice with the same background strain, and 2 other lymphoid (non-B non-T) neoplasms occurred in the control group [169]. Quite surprisingly, GD mice with lymphoma had lower GlcCer and glucosylsphingosine levels than the animals without tumors [169]. Administration of a new potent and selective GCS inhibitor to this mouse model led to a decline of the accumulated GSLs and a subsequent reduction in the frequency of malignant lymphoproliferation [170].

- Alterations in the malignant cell

In the second hypothesis, facilitation of tumorigenesis in GD could be related to the disturbed sphingolipid metabolism in cancer cells, either because of accumulation of GlcCer (or glucosylsphingosine) or because of reduced formation of ceramide, resulting in deleterious changes in the pro and anti-proliferative balance (see Fig. 1). Indeed, as emphasized before, GlcCer content is elevated in various resistant cell lines [96]. GlcCer has long been suspected to sustain cell proliferation [171,172]. MDCK cells treated with conduritol B-epoxide showed a time-dependent accumulation of GlcCer accompanied by an increased cellular proliferation [173] [174]. GlcCer and GM3 ganglioside have been found elevated in human autosomal dominant polycystic kidney disease and in a mouse model of this disease. Exogenous GlcCer (and lactosylceramide) could also increase proliferation of kidney proximal tubular cells [175]. Depletion of GlcCer and GM3 in rat kidney epithelial cells by a GCS pharmacological inhibitor or siRNA, delayed cell cycle progression *in vitro* and blocked progression of polycystic kidney disease *in vivo* [174]. Interestingly, treatment of cancer cells with a GCS inhibitor induced an epithelial-to-mesenchymal transition phenotype that could be abrogated by addition of specific GSLs [176,177]. In addition, as discussed before, GlcCer influences the MDR phenotype and elimination of cancer cells. Incubation of

breast cancer MCF7 and MCF7R (MCF7 adriamycin-resistant) cells with conduritol B-epoxide was able to attenuate cytotoxicity of daunorubicin [178]. Moreover, in a RNA interference screen to identify genes influencing sensitivity of different cancer cell types to chemotherapeutic agents, siRNA for GBA1 was found to promote resistance to paclitaxel in three different cancer cell lines [179]. In human colon carcinoma cells, GBA1 silencing prevented the paclitaxel-induced decrease of phosphorylated Akt levels, promoting cell survival [179]. Finally, exogenous GlcCer could block assembly of NADPH oxidase 2 in response to chemotherapeutics in glioblastoma and neuroblastoma cells [180,181].

GBA1 seems also to play an important role in the regulated formation of ceramide through the sphingosine salvage pathway. Indeed, the ceramide that originates from the hydrolysis of GlcCer by GlcCerase can be further degraded to sphingosine in the acidic compartments by acid ceramidase. Then, sphingosine can exit the lysosome and be recycled to form ceramide through the action of ceramide synthases. Breast cancer cells (MCF-7), treated with phorbol esters to activate protein kinase C (PKC) presented a decline in GlcCer level and an increased ceramide (mainly C16-ceramide) level [182]. Silencing GBA1 decreased phorbol ester-induced formation of ceramide by 50% and blocked degradation of GlcCer and generation of sphingosine [182]. The other 50% of ceramide came from acid sphingomyelinase-mediated hydrolysis of sphingomyelin. The salvage pathway of ceramide formation (by use of sphingosine) was suggested to involve PKCδ activation. Such a mechanism could activate anticancer drug-induced apoptosis [183]. Additional studies from the same group showed that this GBA1-ceramide pathway can counteract phosphorylation (activation) of p38δ and suppress the phorbol ester-induced IL-6 biosynthesis [184]. This signalling pathway may explain the elevation of the circulating levels of IL-6 seen in GD and, because of the well-known effects of IL-6, the accompanying osteolytic lesions and high incidence of MM. Thus, GBA1 might play important roles in the cancer cell by regulating proliferation, cytokine production, and chemoresistance.

In this context, we have investigated whether the behavior of cancer cells is affected by GBA1 deficiency. To this end, we created a cellular model of GD in a melanoma cell line. After transfection of human A375 melanoma cells with shRNA directed against GBA1, and puromycin-mediated selection, several melanoma clones were isolated. Two A375 clones (Ash1 end Ash2) showed a decrease in GBA1 protein expression and acid β-glucosidase activity (Fig. 2A and B). In the absence (or in the presence of low concentrations) of bovine serum, the number of viable cells in two-dimensional culture was higher for the GBA1-depleted clones (Fig. 2C), suggesting that a reduced GBA1 activity may help cancer cells to survive under stressful conditions. Of note, in three-dimensional agar culture the clones with reduced GBA1 expression formed loosened aggregates that were less delimited than the spheroids formed by control clones (Fig. 2D), possibly because enhanced migratory properties. As previously discussed, these effects might be related to a higher GlcCer and/or lower ceramide content in the clones with reduced GBA1.

A further hypothesis regarding the link between GBA1, GD and cancer relates to protein misfolding/aggregation and α-synuclein, a key protein implicated in the pathogenesis of PD. Indeed, *GBA1* mutations and possibly alterations of GlcCer metabolism are implicated in the development of PD (see section 3.1.2). The molecular links between GD and PD becomes better understood [185,186], pointing to some similarities with cancer. Moreover, there is an epidemiological association between PD and melanoma [187]. α-Synuclein, a primary neuronal protein, is expressed in a variety of brain tumors as well as peripheral cancers, including ovarian, breast, colorectal tumors and melanoma. Growth of B16 melanoma and mammary gland adenocarcinoma (E0771) cells is enhanced in transgenic mice expressing the human A53T α-synuclein form [188,189]. Moreover, overexpression of α-synuclein in

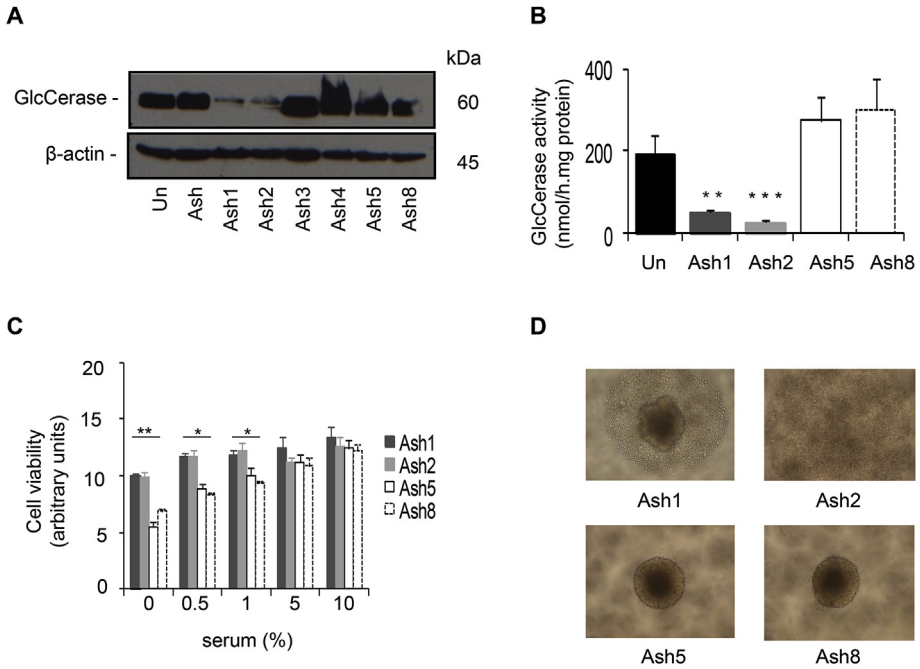


**Fig. 2.** Effect of GBA1 silencing on the growth of A375 human melanoma cells. Untransfected (Un) and shRNA-transfected (pool Ash and clones Ash1, Ash2, Ash3, Ash4, Ash5 and Ash8) cells were tested for: A, the expression of GBA1 by Western blot; B, the enzyme activity of GlcCerase against a fluorogenic substrate (n = 3); C, the cell viability (as measured by the MTT test) after 3 days in culture in the presence of varying concentrations of serum (n = 5); and D, the ability to form spheroids. For the latter experiments, 96-well-plates were precoated with DMEM medium containing 5% agarose. Then, 3000 cells suspended in DMEM containing 10% serum were overlaid onto the precoated wells. After 6 days incubation at 37 °C in 5% $CO_2$ atmosphere, spheroids were photographed. Representative pictures of three independent experiments are shown. Asterisks indicate significant differences between Ash1 or Ash2 clones and Ash5 or Ash8 clones (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Please cite this article in press as: L. Astudillo, et al., Glucosylceramidases and malignancies in mammals, Biochimie (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.11.009

B16 melanoma and breast adenocarcinoma cells enhanced proliferation [189]. Finally, the ER-associated protein degradation process might also play a role in GD-associated oncogenesis because the mutant ER-retained GlcCerase might occupy E3 ubiquitin ligases, that are normally involved in the degradation of oncoproteins which in turn would accumulate [57].

### 5.2. Non-lysosomal glucosylceramidase and cancer

A transcriptomic study in multiple melanoma cell lines revealed a decreased level of GBA2 expression as compared to normal melanocytic cells [190]. GBA2 activity was also lower in melanoma cells than in melanocytes. Inducible expression of GBA2 in human A375 melanoma cells led to enhanced GlcCer breakdown and ceramide (C16:0 and C24:0) formation, and resulted in significant inhibition of melanoma cell proliferation *in vitro*, but also *in vivo* when injected subcutaneoulsy into nude mice [190]. The induced expression of GBA2 triggered an ER-specific unfolded protein response that causes apoptosis in melanoma cells [190]. The observed effects of GBA2 were due to its catalytic activity. This report not only provided evidence for the role of GlcCer breakdown as a source of a biologically-active ceramide, but also evidenced for the first time, the ability for GBA2 to modulate the cell life/death switch.

### 5.3. Klotho-related protein and cancer

Very little is known about the role of this enzyme in cancer. Analysis of GBA3 expression in three patients with renal cell carcinoma showed that tumor tissues expressed lower mRNA levels than non-tumor regions [191]. Gene expression profiling of intestinal metaplasic lesions from patients, which are precursors of gastric cancers, identified *GBA3* among the top 25 genes that were significantly up-regulated [192] (see also Supplemental Table). Of note, silencing of GBA3 in human colon carcinoma cells promoted resistance to paclitaxel and attenuated mitotic arrest [179].

## 6. Concluding remarks

Several sphingolipids, including ceramide and sphingosine 1-phosphate, have already been identified to play crucial roles in various steps of oncogenesis such as cancer development, progression or chemotherapeutic responses. GlcCerases and their substrate have emerged as further important players in cancer. By far, much more has been learnt about GBA1 than the other putative GlcCerases. This is due to prior abundant knowledge about this lysosomal enzyme and the corresponding lysosomal storage disorder, GD. However, a number of issues as to the functions of GlcCerases in cancer still remain to be definitely addressed. For instance, are their effects solely related to changes in the intracellular content of their substrate or product (and independent of structural changes of the enzyme protein)? How degradation of GlcCer by a given GlcCerase influences cell functions? Do the effects strictly depend on the subcellular localization of the GlcCerase? Which sphingolipid (i.e., GlcCer or a GlcCer-derived metabolite) actually mediates the cell responses? What is the molecular link between lysosomal GlcCerase, GD (and PD) and neoplasms? Solving these questions will undoubtedly help understand the enigmatic role of sphingolipid metabolism in cancer and possibly open novel strategies to fight cancer.

## Conflict of interest

Dr. L. Astudillo received an award from Shire HGT.

## Acknowledgments

Financial support by INSERM, Université Paul Sabatier, Ligue Contre le Cancer (Equipe Labellisée 2013), and VML is gratefully acknowledged.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.11.009.

## References

[1] J.L.W. Thudichum, A Treatise on the Chemical Constitution of the Brain, 1884, p. 149.
[2] A.H. Futerman, Y.A. Hannun, The complex life of simple sphingolipids, EMBO Rep. 5 (2004) 777–782.
[3] Y.A. Hannun, L.M. Obeid, Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9 (2008) 139–150.
[4] S.A. Morad, M.C. Cabot, Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells, Nat. Rev. Cancer 13 (2013) 51–65.
[5] B. Ogretmen, Y.A. Hannun, Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment, Nat. Rev. Cancer 4 (2004) 604–616.
[6] B.J. Pettus, C.E. Chalfant, Y.A. Hannun, Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives, Biochim. Biophys. Acta 1585 (2002) 114–125.
[7] E. Gulbins, P.L. Li, Physiological and pathophysiological aspects of ceramide, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 290 (2006) R11–R26.
[8] M.E. Venable, J.Y. Lee, M.J. Smyth, A. Bielawska, L.M. Obeid, Role of ceramide in cellular senescence, J. Biol. Chem. 270 (1995) 30701–30708.
[9] Y. Yildiz, H. Matern, B. Thompson, J.C. Allegood, R.L. Warren, D.M. Ramirez, R.E. Hammer, F.K. Hamra, S. Matern, D.W. Russell, Mutation of beta-glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility, J. Clin. Investig. 116 (2006) 2985–2994.
[10] K.A. Karlsson, Sphingolipid long chain bases, Lipids 5 (1970) 878–891.
[11] S. Degroote, J. Wolthoorn, G. van Meer, The cell biology of glycosphingolipids, Semin. Cell Dev. Biol. 15 (2004) 375–387.
[12] C.R. Gault, L.M. Obeid, Y.A. Hannun, An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown, Adv. Exp. Med. Biol. 688 (2010) 1–23.
[13] C.A. Lingwood, Glycosphingolipid functions, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 3 (2011) a004788.
[14] R. Jennemann, H.J. Grone, Cell-specific in vivo functions of glycosphingolipids: Lessons from genetic deletions of enzymes involved in glycosphingolipid synthesis, Prog. Lipid Res. 52 (2013) 231–248.
[15] T. Yamashita, R. Wada, T. Sasaki, C. Deng, U. Bierfreund, K. Sandhoff, R.L. Proia, A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96 (1999) 9142–9147.
[16] Y. Ishibashi, A. Kohyama-Koganeya, Y. Hirabayashi, New insights on glucosylated lipids: metabolism and functions, Biochim. Biophys. Acta 1831 (2013) 1475–1485.
[17] Y.A. Hannun, L.M. Obeid, Many ceramides, J. Biol. Chem. 286 (2011) 27855–27862.
[18] S. Basu, B. Kaufman, S. Roseman, Enzymatic synthesis of ceramide-glucose and ceramide-lactose by glycosyltransferases from embryonic chicken brain, J. Biol. Chem. 243 (1968) 5802–5804.
[19] S. Ichikawa, H. Sakiyama, G. Suzuki, K.I. Hidari, Y. Hirabayashi, 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 (1996) 4638–4643.
[20] K. Hanada, K. Kumagai, S. Yasuda, Y. Miura, M. Kawano, M. Fukasawa, M. Nishijima, Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide, Nature 426 (2003) 803–809.
[21] P. Giussani, T. Colleoni, L. Brioschi, R. Bassi, K. Hanada, G. Tettamanti, L. Riboni, P. Viani, Ceramide traffic in C6 glioma cells: evidence for CERT-dependent and independent transport from ER to the Golgi apparatus, Biochim. Biophys. Acta 1781 (2008) 40–51.
[22] S. Ichikawa, K. Ozawa, Y. Hirabayashi, Assignment of a UDP-glucose: ceramide glucosyltransferase gene (UGCG) to human chromosome band 9q31 by in situ hybridization, Cytogenet. Cell Genet. 79 (1997) 233–234.
[23] D.L. Marks, K. Wu, P. Paul, Y. Kamisaka, R. Watanabe, R.E. Pagano, Oligomerization and topology of the golgi membrane protein glucosylceramide synthase, J. Biol. Chem. 274 (1999) 451–456.
[24] G. D'Angelo, 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, M.A. De Matteis, Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide, Nature 449 (2007) 62–67.
[25] D. Halter, S. Neumann, S.M. van Dijk, J. Wolthoorn, A.M. de Maziere, O.V. Vieira, P. Mattjus, J. Klumperman, G. van Meer, H. Sprong, Pre- and post-Golgi translocation of glucosylceramide in glycosphingolipid synthesis, J. Cell Biol. 179 (2007) 101–115.
[26] G. van Meer, J. Wolthoorn, S. Degroote, The fate and function of glycosphingolipid glucosylceramide, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 358

(2003) 869–873.
[27] S. van der Poel, J. Wolthoorn, D. van den Heuvel, M. Egmond, S. Groux-Degroote, S. Neumann, H. Gerritsen, G. van Meer, H. Sprong, Hyperacidification of trans-golgi network and endo/lysosomes in melanocytes by glucosylceramide-dependent V-ATPase activity, Traffic 12 (2011) 1634–1647.
[28] T. Kolter, K. Sandhoff, Lysosomal degradation of membrane lipids, FEBS Lett. 584 (2010) 1700–1712.
[29] J. Potter, M.W. Ho, H. Bolton, A.J. Furth, D.M. Swallow, B. Griffiths, Human lactase and the molecular basis of lactase persistence, Biochem. Genet. 23 (1985) 423–439.
[30] R.O. Brady, J. Kanfer, D. Shapiro, The metabolism of glucocerebrosides. I. Purification and properties of a glucocerebroside-cleaving enzyme from spleen tissue, J. Biol. Chem. 240 (1965) 39–43.
[31] G.A. Grabowski, S. Gatt, M. Horowitz, Acid beta-glucosidase: enzymology and molecular biology of Gaucher disease, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 25 (1990) 385–414.
[32] B. Henrissat, I. Callebaut, S. Fabrega, P. Lehn, J.P. Mornon, G. Davies, Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92 (1995) 7090–7094.
[33] H. Akiyama, S. Kobayashi, Y. Hirabayashi, K. Murakami-Murofushi, Cholesterol glucosylation is catalyzed by transglucosylation reaction of beta-glucosidase 1, Biochem. Biophys. Res. Commun. 441 (2013) 838–843.
[34] R.A. Barneveld, W. Keijzer, F.P. Tegelaers, E.I. Ginns, A. Geurts van Kessel, R.O. Brady, J.A. Barranger, J.M. Tager, H. Galjaard, A. Westerveld, A.J. Reuser, Assignment of the gene coding for human beta-glucocerebrosidase to the region q21-q31 of chromosome 1 using monoclonal antibodies, Hum. Genet. 64 (1983) 227–231.
[35] E.I. Ginns, P.V. Choudary, B.M. Martin, S. Winfield, B. Stubblefield, J. Mayor, D. Merkle-Lehman, G.J. Murray, L.A. Bowers, J.A. Barranger, Isolation of cDNA clones for human beta-glucocerebrosidase using the lambda gt11 expression system, Biochem. Biophys. Res. Commun. 123 (1984) 574–580.
[36] J. Sorge, C. West, B. Westwood, E. Beutler, Molecular cloning and nucleotide sequence of human glucocerebrosidase cDNA, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82 (1985) 7289–7293.
[37] A. Berg-Fussman, M.E. Grace, Y. Ioannou, G.A. Grabowski, Human acid beta-glucosidase. N-glycosylation site occupancy and the effect of glycosylation on enzymatic activity, J. Biol. Chem. 268 (1993) 14861–14866.
[38] D. Reczek, M. Schwake, J. Schroder, H. Hughes, J. Blanz, X. Jin, W. Brondyk, S. Van Patten, T. Edmunds, P. Saftig, LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase, Cell 131 (2007) 770–783.
[39] Y. Zhao, J. Ren, S. Padilla-Parra, E.E. Fry, D.I. Stuart, Lysosome sorting of beta-glucocerebrosidase by LIMP-2 is targeted by the mannose 6-phosphate receptor, Nat. Commun. 5 (2014) 4321.
[40] J. Blanz, F. Zunke, S. Markmann, M. Damme, T. Braulke, P. Saftig, M. Schwake, Mannose 6-phosphate-independent Lysosomal Sorting of LIMP-2, Traffic 16 (10) (2015 Oct) 1127–1136.
[41] M.E. Grace, G.A. Grabowski, Human acid beta-glucosidase: glycosylation is required for catalytic activity, Biochem. Biophys. Res. Commun. 168 (1990) 771–777.
[42] S. Miao, J.D. McCarter, M.E. Grace, G.A. Grabowski, R. Aebersold, S.G. Withers, Identification of Glu340 as the active-site nucleophile in human glucocerebrosidase by use of electrospray tandem mass spectrometry, J. Biol. Chem. 269 (1994) 10975–10978.
[43] H. Dvir, M. Harel, A.A. McCarthy, L. Toker, I. Silman, A.H. Futerman, J.L. Sussman, X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease, EMBO Rep. 4 (2003) 704–709.
[44] L. Premkumar, A.R. Sawkar, S. Boldin-Adamsky, L. Toker, I. Silman, J.W. Kelly, A.H. Futerman, J.L. Sussman, X-ray structure of human acid-beta-glucosidase covalently bound to conduritol-B-epoxide. Implications for Gaucher disease, J. Biol. Chem. 280 (2005) 23815–23819.
[45] S. Fabrega, P. Durand, P. Codogno, C. Bauvy, C. Delomenie, B. Henrissat, B.M. Martin, C. McKinney, E.I. Ginns, J.P. Mornon, P. Lehn, Human glucocerebrosidase: heterologous expression of active site mutants in murine null cells, Glycobiology 10 (2000) 1217–1224.
[46] S. Fabrega, P. Durand, J.P. Mornon, P. Lehn, The active site of human glucocerebrosidase: structural predictions and experimental validations, J. Soc. Biol. 196 (2002) 151–160.
[47] B. Brumshtein, H.M. Greenblatt, T.D. Butters, Y. Shaaltiel, D. Aviezer, I. Silman, A.H. Futerman, J.L. Sussman, Crystal structures of complexes of N-butyl- and N-nonyl-deoxynojirimycin bound to acid beta-glucosidase: insights into the mechanism of chemical chaperone action in Gaucher disease, J. Biol. Chem. 282 (2007) 29052–29058.
[48] S.G. Withers, K. Umezawa, Cyclophellitol: a naturally occurring mechanism-based inactivator of beta-glucosidases, Biochem. Biophys. Res. Commun. 177 (1991) 532–537.
[49] G.A. Grabowski, K. Osiecki-Newman, T. Dinur, D. Fabbro, G. Legler, S. Gatt, R.J. Desnick, Human acid beta-glucosidase. Use of conduritol B epoxide derivatives to investigate the catalytically active normal and Gaucher disease enzymes, J. Biol. Chem. 261 (1986) 8263–8269.
[50] P.K. Das, G.J. Murray, A.E. Gal, J.A. Barranger, Glucocerebrosidase deficiency and lysosomal storage of glucocerebroside induced in cultured macrophages, Exp. Cell Res. 168 (1987) 463–474.
[51] D.S. Newburg, S. Yatziv, R.H. McCluer, S. Raghavan, beta-Glucosidase inhibition in murine peritoneal macrophages by conduritol-B-epoxide: an in vitro model of the Gaucher cell, Biochim. Biophys. Acta 877 (1986) 121–126.
[52] P.M. Campeau, M. Rafei, M.N. Boivin, Y. Sun, G.A. Grabowski, J. Galipeau, Characterization of Gaucher disease bone marrow mesenchymal stromal cells reveals an altered inflammatory secretome, Blood 114 (2009) 3181–3190.
[53] L.K. Hein, P.J. Meikle, J.J. Hopwood, M. Fuller, Secondary sphingolipid accumulation in a macrophage model of Gaucher disease, Mol. Genet. Metab. 92 (2007) 336–345.
[54] A. Delgado, J. Casas, A. Llebaria, J.L. Abad, G. Fabrias, Inhibitors of sphingolipid metabolism enzymes, Biochim. Biophys. Acta 1758 (2006) 1957–1977.
[55] R.O. Brady, J.N. Kanfer, D. Shapiro, Metabolism of Glucocerebrosides. Ii. Evidence of an enzymatic deficiency in Gaucher's disease, Biochem. Biophys. Res. Commun. 18 (1965) 221–225.
[56] G.A. Grabowski, Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease, Lancet 372 (2008) 1263–1271.
[57] I. Bendikov-Bar, M. Horowitz, Gaucher disease paradigm: from ERAD to comorbidity, Hum. Mutat. 33 (2012) 1398–1407.
[58] S. Tsuji, B.M. Martin, J.A. Barranger, B.K. Stubblefield, M.E. LaMarca, E.I. Ginns, Genetic heterogeneity in type 1 Gaucher disease: multiple genotypes in Ashkenazic and non-Ashkenazic individuals, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85 (1988) 2349–2352.
[59] S. Tsuji, P.V. Choudary, B.M. Martin, B.K. Stubblefield, J.A. Mayor, J.A. Barranger, E.I. Ginns, A mutation in the human glucocerebrosidase gene in neuronopathic Gaucher's disease, N. Engl. J. Med. 316 (1987) 570–575.
[60] S. Bohlega, M. Kambouris, M. Shahid, M. Al Homsi, W. Al Sous, Gaucher disease with oculomotor apraxia and cardiovascular calcification (Gaucher type IIIC), Neurology 54 (2000) 261–263.
[61] I. Ron, M. Horowitz, ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity, Hum. Mol. Genet. 14 (2005) 2387–2398.
[62] P.J. Meikle, J.J. Hopwood, A.E. Clague, W.F. Carey, Prevalence of lysosomal storage disorders, Jama 281 (1999) 249–254.
[63] T. Farfel-Becker, E.B. Vitner, A.H. Futerman, Animal models for Gaucher disease research, Dis. Model Mech. 4 (2011) 746–752.
[64] N. Uemura, M. Koike, S. Ansai, M. Kinoshita, T. Ishikawa-Fujiwara, H. Matsui, K. Naruse, N. Sakamoto, Y. Uchiyama, T. Todo, S. Takeda, H. Yamakado, R. Takahashi, Viable neuronopathic Gaucher disease model in Medaka (Oryzias latipes) displays axonal accumulation of alpha-synuclein, PLoS Genet. 11 (2015) e1005065.
[65] D.J. Kuter, A. Mehta, C.E. Hollak, P. Giraldo, D. Hughes, N. Belmatoug, M. Brand, A. Muller, B. Schaaf, R. Giorgino, A. Zimran, Miglustat therapy in type 1 Gaucher disease: clinical and safety outcomes in a multicenter retrospective cohort study, Blood Cells Mol. Dis. 51 (2013) 116–124.
[66] E. Lukina, N. Watman, E.A. Arreguin, M. Dragosky, M. Iastrebner, H. Rosenbaum, M. Phillips, G.M. Pastores, R.S. Kamath, D.I. Rosenthal, M. Kaper, T. Singh, A.C. Puga, M.J. Peterschmitt, Improvement in hematological, visceral, and skeletal manifestations of Gaucher disease type 1 with oral eliglustat tartrate (Genz-112638) treatment: 2-year results of a phase 2 study, Blood 116 (2010) 4095–4098.
[67] D. Schnabel, M. Schroder, K. Sandhoff, Mutation in the sphingolipid activator protein 2 in a patient with a variant of Gaucher disease, FEBS Lett. 284 (1991) 57–59.
[68] A. Diaz-Font, B. Cormand, R. Santamaria, L. Vilageliu, D. Grinberg, A. Chabas, A mutation within the saposin D domain in a Gaucher disease patient with normal glucocerebrosidase activity, Hum. Genet. 117 (2005) 275–277.
[69] R.J. Tamargo, A. Velayati, E. Goldin, E. Sidransky, The role of saposin C in Gaucher disease, Mol. Genet. Metab. 106 (2012) 257–263.
[70] G. Wilkening, T. Linke, K. Sandhoff, Lysosomal degradation on vesicular membrane surfaces. Enhanced glucosylceramide degradation by lysosomal anionic lipids and activators, J. Biol. Chem. 273 (1998) 30271–30278.
[71] A.M. Vaccaro, F. Ciaffoni, M. Tatti, R. Salvioli, A. Barca, D. Tognozzi, C. Scerch, pH-dependent conformational properties of saposins and their interactions with phospholipid membranes, J. Biol. Chem. 270 (1995) 30576–30580.
[72] S.F. Berkovic, L.M. Dibbens, A. Oshlack, J.D. Silver, M. Katerelos, D.F. Vears, R. Lullmann-Rauch, J. Blanz, K.W. Zhang, J. Stankovich, R.M. Kalnins, J.P. Dowling, E. Andermann, F. Andermann, E. Faldini, R. D'Hooge, L. Vadlamudi, R.A. Macdonell, B.L. Hodgson, M.A. Bayly, J. Savige, J.C. Mulley, G.K. Smyth, D.A. Power, P. Saftig, M. Bahlo, Array-based gene discovery with three unrelated subjects shows SCARB2/LIMP-2 deficiency causes myoclonus epilepsy and glomerulosclerosis, Am. J. Hum. Genet. 82 (2008) 673–684.
[73] A. Dardis, M. Filocamo, S. Grossi, G. Ciana, S. Franceschetti, S. Dominissini, G. Rubboli, M. Di Rocco, B. Bembi, Biochemical and molecular findings in a patient with myoclonic epilepsy due to a mistarget of the beta-glucosidase enzyme, Mol. Genet. Metab. 97 (2009) 309–311.
[74] A. Velayati, J. DePaolo, N. Gupta, J.H. Choi, N. Moaven, W. Westbroek, O. Goker-Alpan, E. Goldin, B.K. Stubblefield, E. Kolodny, N. Tayebi, E. Sidransky, A mutation in SCARB2 is a modifier in Gaucher disease, Hum. Mutat. 32 (2011) 1232–1238.
[75] E. Sidransky, M.A. Nalls, J.O. Aasly, J. Aharon-Peretz, G. Annesi, E.R. Barbosa, A. Bar-Shira, D. Berg, J. Bras, A. Brice, C.M. Chen, L.N. Clark, C. Condroyer, E.V. De Marco, A. Durr, M.J. Eblan, S. Fahn, M.J. Farrer, H.C. Fung, Z. Gan-Or, T. Gasser, R. Gershoni-Baruch, N. Giladi, A. Griffith, T. Gurevich, C. Januario,

P. Kropp, A.E. Lang, G.J. Lee-Chen, S. Lesage, K. Marder, I.F. Mata, A. Mirelman, J. Mitsui, I. Mizuta, G. Nicoletti, C. Oliveira, R. Ottman, A. Orr-Urtreger, L.V. Pereira, A. Quattrone, E. Rogaeva, A. Rolfs, H. Rosenbaum, R. Rozenberg, A. Samii, T. Samaddar, C. Schulte, M. Sharma, A. Singleton, M. Spitz, E.K. Tan, N. Tayebi, T. Toda, A.R. Troiano, S. Tsuji, M. Wittstock, T.G. Wolfsberg, Y.R. Wu, C.P. Zabetian, Y. Zhao, S.G. Ziegler, Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease, N. Engl. J. Med. 361 (2009) 1651–1661.

[76] J.R. Mazzulli, Y.H. Xu, Y. Sun, A.L. Knight, P.J. McLean, G.A. Caldwell, E. Sidransky, G.A. Grabowski, D. Krainc, Gaucher disease glucocerebrosidase and alpha-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies, Cell 146 (2011) 37–52.

[77] W. Westbroek, A.M. Gustafson, E. Sidransky, Exploring the link between glucocerebrosidase mutations and Parkinsonism, Trends Mol. Med. 17 (2011) 485–493.

[78] S. van Weely, M. Brandsma, A. Strijland, J.M. Tager, J.M. Aerts, Demonstration of the existence of a second, non-lysosomal glucocerebrosidase that is not deficient in Gaucher disease, Biochim. Biophys. Acta 1181 (1993) 55–62.

[79] R.G. Boot, M. Verhoek, W. Donker-Koopman, A. Strijland, J. van Marle, H.S. Overkleeft, T. Wennekes, J.M. Aerts, Identification of the non-lysosomal glucosylceramidase as beta-glucosidase 2, J. Biol. Chem. 282 (2007) 1305–1312.

[80] H.G. Koerschen, Y. Yildiz, D.N. Raju, S. Schonauer, W. Boenigk, V. Jansen, E. Kremmer, U.B. Kaupp, D. Wachten, The non-lysosomal beta-glucosidase GBA2 is a non-integral membrane-associated protein at the ER and golgi, J. Biol. Chem. 288 (2013) 3381–3393.

[81] H. Matern, H. Heinemann, G. Legler, S. Matern, Purification and characterization of a microsomal bile acid beta-glucosidase from human liver, J. Biol. Chem. 272 (1997) 11261–11267.

[82] H. Matern, H. Boermans, F. Lottspeich, S. Matern, Molecular cloning and expression of human bile acid beta-glucosidase, J. Biol. Chem. 276 (2001) 37929–37933.

[83] M.A. Gonzalez-Carmona, R. Sandhoff, F. Tacke, A. Vogt, S. Weber, A.E. Canbay, G. Rogler, T. Sauerbruch, F. Lammert, Y. Yildiz, Beta-glucosidase 2 knockout mice with increased glucosylceramide show impaired liver regeneration, Liver Int. 32 (2012) 1354–1362.

[84] C.M. Ridley, K.E. Thur, J. Shanahan, N.B. Thillaiappan, A. Shen, K. Uhl, C.M. Walden, A.A. Rahim, S.N. Waddington, F.M. Platt, A.C. van der Spoel, Beta-glucosidase 2 (GBA2) activity and imino sugar pharmacology, J. Biol. Chem. 288 (36) (2013 Sep) 626052–626066.

[85] H.S. Overkleeft, G.H. Renkema, J. Neele, P. Vianello, I.O. Hung, A. Strijland, A.M. van der Burg, G.J. Koomen, U.K. Pandit, J.M. Aerts, Generation of specific deoxynojirimycin-type inhibitors of the non-lysosomal glucosylceramidase, J. Biol. Chem. 273 (1998) 26522–26527.

[86] A. Ghisaidoobe, P. Bikker, A.C. de Bruijn, F.D. Godschalk, E. Rogaar, M.C. Guijt, P. Hagens, J.M. Halma, S.M. Van't Hart, S.B. Luitjens, V.H. van Rixel, M. Wijzenbroek, T. Zweegers, W.E. Donker-Koopman, A. Strijland, R. Boot, G. van der Marel, H.S. Overkleeft, J.M. Aerts, R.J. van den Berg, Identification of potent and selective glucosylceramide synthase inhibitors from a library of N-alkylated iminosugars, ACS Med. Chem. Lett. 2 (2010) 119–123.

[87] E. Martin, R. Schule, K. Smets, A. Rastetter, A. Boukhris, J.L. Loureiro, M.A. Gonzalez, E. Mundwiller, T. Deconinck, M. Wessner, L. Jornea, A.C. Oteyza, A. Durr, J.J. Martin, L. Schols, C. Mhiri, F. Lamari, S. Zuchner, P. De Jonghe, E. Kabashi, A. Brice, G. Stevanin, Loss of function of glucocerebrosidase GBA2 is responsible for motor neuron defects in hereditary spastic paraplegia, Am. J. Hum. Genet. 92 (2013) 238–244.

[88] C. Votsi, E. Zamba-Papanicolaou, L.T. Middleton, M. Pantzaris, K. Christodoulou, A novel GBA2 gene missense mutation in spastic ataxia, Ann. Hum. Genet. 78 (2014) 13–22.

[89] A. Citterio, A. Arnoldi, E. Panzeri, M.G. D'Angelo, M. Filosto, R. Dilena, F. Arrigoni, M. Castelli, C. Maghini, C. Germiniasi, F. Menni, A. Martinuzzi, N. Bresolin, M.T. Bassi, Mutations in CYP2U1, DDHD2 and GBA2 genes are rare causes of complicated forms of hereditary spastic paraparesis, J. Neurol. 261 (2014) 373–381.

[90] M.B. Hammer, G. Eleuch-Fayache, L.V. Schottlaender, H. Nehdi, J.R. Gibbs, S.K. Arepalli, S.B. Chong, D.G. Hernandez, A. Sailer, G. Liu, P.K. Mistry, H. Cai, G. Shrader, C. Sassi, Y. Bouhlal, H. Houlden, F. Hentati, R. Amouri, A.B. Singleton, Mutations in GBA2 cause autosomal-recessive cerebellar ataxia with spasticity, Am. J. Hum. Genet. 92 (2013) 245–251.

[91] R.H. Glew, S.P. Peters, A.R. Christopher, Isolation and characterization of beta-glucosidase from the cytosol of rat kidney cortex, Biochim. Biophys. Acta 422 (1976) 179–199.

[92] L.B. Daniels, P.J. Coyle, Y.B. Chiao, R.H. Glew, R.S. Labow, Purification and characterization of a cytosolic broad specificity beta-glucosidase from human liver, J. Biol. Chem. 256 (1981) 13004–13013.

[93] J.G. Berrin, W.R. McLauchlan, P. Needs, G. Williamson, A. Puigserver, P.A. Kroon, N. Juge, Functional expression of human liver cytosolic beta-glucosidase in Pichia pastoris. Insights into its role in the metabolism of dietary glucosides, Eur. J. Biochem. 269 (2002) 249–258.

[94] Y. Hayashi, N. Okino, Y. Kakuta, T. Shikanai, M. Tani, H. Narimatsu, M. Ito, Klotho-related protein is a novel cytosolic neutral beta-glycosylceramidase, J. Biol. Chem. 282 (2007) 30889–30900.

[95] N. Dekker, T. Voorn-Brouwer, M. Verhoek, T. Wennekes, R.S. Narayan, D. Speijer, C.E. Hollak, H.S. Overkleeft, R.G. Boot, J.M. Aerts, The cytosolic beta-glucosidase GBA3 does not influence type 1 Gaucher disease manifestation, Blood Cells Mol. Dis. 46 (2011) 19–26.

[96] Y. Lavie, H. Cao, S.L. Bursten, A.E. Giuliano, M.C. Cabot, Accumulation of glucosylceramides in multidrug-resistant cancer cells, J. Biol. Chem. 271 (1996) 19530–19536.

[97] A. Lucci, W.I. Cho, T.Y. Han, A.E. Giuliano, D.L. Morton, M.C. Cabot, Glucosylceramide: a marker for multiple-drug resistant cancers, Anticancer Res. 18 (1998) 475–480.

[98] Y. Lavie, G. Fiucci, M. Liscovitch, Upregulation of caveolin in multidrug resistant cancer cells: functional implications, Adv. Drug Deliv. Rev. 49 (2001) 317–323.

[99] Y.Y. Liu, T.Y. Han, A.E. Giuliano, M.C. Cabot, Expression of glucosylceramide synthase, converting ceramide to glucosylceramide, confers adriamycin resistance in human breast cancer cells, J. Biol. Chem. 274 (1999) 1140–1146.

[100] Y.Y. Liu, T.Y. Han, A.E. Giuliano, S. Ichikawa, Y. Hirabayashi, M.C. Cabot, Glycosylation of ceramide potentiates cellular resistance to tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis, Exp. Cell Res. 252 (1999) 464–470.

[101] M. Itoh, T. Kitano, M. Watanabe, T. Kondo, T. Yabu, Y. Taguchi, K. Iwai, M. Tashima, T. Uchiyama, T. Okazaki, Possible role of ceramide as an indicator of chemoresistance: decrease of the ceramide content via activation of glucosylceramide synthase and sphingomyelin synthase in chemoresistant leukemia, Clin. Cancer Res. 9 (2003) 415–423.

[102] B. Ogretmen, D. Schady, J. Usta, R. Wood, J.M. Kraveka, C. Luberto, H. Birbes, Y.A. Hannun, L.M. Obeid, Role of ceramide in mediating the inhibition of telomerase activity in A549 human lung adenocarcinoma cells, J. Biol. Chem. 276 (2001) 24901–24910.

[103] Y.Y. Liu, R.A. Hill, Y.T. Li, Ceramide glycosylation catalyzed by glucosylceramide synthase and cancer drug resistance, Adv. Cancer Res. 117 (2013) 59–89.

[104] Y.Y. Liu, T.Y. Han, A.E. Giuliano, N. Hansen, M.C. Cabot, Uncoupling ceramide glycosylation by transfection of glucosylceramide synthase antisense reverses adriamycin resistance, J. Biol. Chem. 275 (2000) 7138–7143.

[105] W. Deng, R. Li, S. Ladisch, Influence of cellular ganglioside depletion on tumor formation, J. Natl. Cancer Inst. 92 (2000) 912–917.

[106] M. Guerrera, S. Ladisch, N-butyldeoxynojirimycin inhibits murine melanoma cell ganglioside metabolism and delays tumor onset, Cancer Lett. 201 (2003) 31–40.

[107] M. Weiss, S. Hettmer, P. Smith, S. Ladisch, Inhibition of melanoma tumor growth by a novel inhibitor of glucosylceramide synthase, Cancer Res. 63 (2003) 3654–3658.

[108] Y.Y. Liu, V. Gupta, G.A. Patwardhan, K. Bhinge, Y. Zhao, J. Bao, H. Mehendale, M.C. Cabot, Y.T. Li, S.M. Jazwinski, Glucosylceramide synthase upregulates MDR1 expression in the regulation of cancer drug resistance through cSrc and beta-catenin signaling, Mol. Cancer 9 (2010) 145.

[109] A.D. Tepper, S.H. Diks, W.J. van Blitterswijk, J. Borst, Glucosylceramide synthase does not attenuate the ceramide pool accumulating during apoptosis induced by CD95 or anti-cancer regimens, J. Biol. Chem. 275 (2000) 34810–34817.

[110] R.J. Veldman, A. Mita, O. Cuvillier, V. Garcia, K. Klappe, J.A. Medin, J.D. Campbell, S. Carpentier, J.W. Kok, T. Levade, The absence of functional glucosylceramide synthase does not sensitize melanoma cells for anticancer drugs, Faseb J. 17 (2003) 1144–1146.

[111] Y.Y. Liu, G.A. Patwardhan, P. Xie, X. Gu, A.E. Giuliano, M.C. Cabot, Glucosylceramide synthase, a factor in modulating drug resistance, is overexpressed in metastatic breast carcinoma, Int. J. Oncol. 39 (2011) 425–431.

[112] C.C. Sun, Z. Zhang, S.Y. Zhang, J. Li, Z.L. Li, C.Z. Kong, Up-regulation of glucosylceramide synthase in urinary bladder neoplasms, Urol. Oncol. 30 (2012) 444–449.

[113] E. Ruckhaberle, T. Karn, L. Hanker, R. Gatje, D. Metzler, U. Holtrich, M. Kaufmann, A. Rody, Prognostic relevance of glucosylceramide synthase (GCS) expression in breast cancer, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 135 (2009) 81–90.

[114] J. Liu, P. Sun, Y. Sun, A. Liu, D. You, F. Jiang, Y. Sun, 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 (2014) 22.

[115] C. Zhang, X. Lin, Y. Song, X. Zhang, H. Li, Q. Wang, Overexpression of glucosylceramide synthase and its significance in the clinical outcome of non-small cell lung cancer, Chin. Med. J. Engl. 127 (2014) 3071–3076.

[116] P. Xie, Y.F. Shen, Y.P. Shi, S.M. Ge, Z.H. Gu, J. Wang, H.J. Mu, B. Zhang, W.Z. Qiao, K.M. Xie, Overexpression of glucosylceramide synthase in associated with multidrug resistance of leukemia cells, Leuk. Res. 32 (2008) 475–480.

[117] J. Jones, H. Otu, D. Spentzos, S. Kolia, M. Inan, W.D. Beecken, C. Fellbaum, X. Gu, M. Joseph, A.J. Pantuck, D. Jonas, T.A. Libermann, Gene signatures of progression and metastasis in renal cell cancer, Clin. Cancer Res. 11 (2005) 5730–5739.

[118] A. Abe, N.S. Radin, J.A. Shayman, Induction of glucosylceramide synthase by synthase inhibitors and ceramide, Biochim. Biophys. Acta 1299 (1996) 333–341.

[119] H. Komori, S. Ichikawa, Y. Hirabayashi, M. Ito, Regulation of UDP-glucose: ceramide glucosyltransferase-1 by ceramide, FEBS Lett. 475 (2000) 247–250.

[120] Y.Y. Liu, J.Y. Yu, D. Yin, G.A. Patwardhan, V. Gupta, Y. Hirabayashi, W.M. Holleran, A.E. Giuliano, S.M. Jazwinski, V. Gouaze-Andersson, D.P. Consoli, M.C. Cabot, A role for ceramide in driving cancer cell resistance

to doxorubicin, Faseb J. 22 (2008) 2541–2551.
[121] Y. Uchida, M. Itoh, Y. Taguchi, S. Yamaoka, H. Umehara, S. Ichikawa, Y. Hirabayashi, W.M. Holleran, T. Okazaki, Ceramide reduction and transcriptional up-regulation of glucosylceramide synthase through doxorubicin-activated Sp1 in drug-resistant HL-60/ADR cells, Cancer Res. 64 (2004) 6271–6279.
[122] Y. Kimura, S.Y. Morita, M. Matsuo, K. Ueda, Mechanism of multidrug recognition by MDR1/ABCB1, Cancer Sci. 98 (2007) 1303–1310.
[123] V. Gouaze-Andersson, J.Y. Yu, A.J. Kreitenberg, A. Bielawska, A.E. Giuliano, M.C. Cabot, Ceramide and glucosylceramide upregulate expression of the multidrug resistance gene MDR1 in cancer cells, Biochim. Biophys. Acta 1771 (2007) 1407–1417.
[124] V. Gouaze, J.Y. Yu, R.J. Bleicher, T.Y. Han, Y.Y. Liu, H. Wang, M.M. Gottesman, A. Bitterman, A.E. Giuliano, M.C. Cabot, Overexpression of glucosylceramide synthase and P-glycoprotein in cancer cells selected for resistance to natural product chemotherapy, Mol. Cancer Ther. 3 (2004) 633–639.
[125] D. Benjamin, H. Joshua, M. Djaldetti, B. Hazaz, J. Pinkhas, Nonsecretory IgD-kappa multiple myeloma in a patient with Gaucher's disease, Scand. J. Haematol. 22 (1979) 179–184.
[126] A.H. Bruckstein, A. Karanas, J.J. Dire, Gaucher's disease associated with Hodgkin's disease, Am. J. Med. 68 (1980) 610–613.
[127] Y. Burstein, G. Rechavi, A.R. Rausen, B. Frisch, Z. Spirer, Association of Gaucher's disease and lymphoid malignancy in 2 children, Scand. J. Haematol. 35 (1985) 445–447.
[128] M. Chang-Lo, L.T. Yam, A.I. Rubenstone, S.O. Schwartz, Gaucher's disease associated with chronic lymphocytic leukaemia, gout and carcinoma, J. Pathol. 116 (1975) 203–207.
[129] G.M. Corbett, P.J. Darbyshire, G.T. Besley, A.C. Parker, Adult Gaucher disease in association with acute leukaemia, Postgrad. Med. J. 63 (1987) 899–900.
[130] D. Garfinkel, Y. Sidi, M. Ben-Bassat, F. Salomon, B. Hazaz, J. Pinkhas, Coexistence of Gaucher's disease and multiple myeloma, Arch. Intern. Med. 142 (1982) 2229–2230.
[131] R.E. Lee, The pathology of Gaucher disease, Prog. Clin. Biol. Res. 95 (1982) 177–217.
[132] G.E. Marti, E.T. Ryan, N.M. Papadopoulos, M. Filling-Katz, N. Barton, T.A. Fleischer, M. Rick, H.R. Gralnick, Polyclonal B-cell lymphocytosis and hypergammaglobulinemia in patients with Gaucher disease, Am. J. Hematol. 29 (1988) 189–194.
[133] M. de Fost, T.A. Out, F.A. de Wilde, E.P. Tjin, S.T. Pals, M.H. van Oers, R.G. Boot, J.F. Aerts, M. Maas, S. Vom Dahl, C.E. Hollak, Immunoglobulin and free light chain abnormalities in Gaucher disease type I: data from an adult cohort of 63 patients and review of the literature, Ann. Hematol. 87 (2008) 439–449.
[134] A. Brautbar, D. Elstein, G. Pines, A. Abrahamov, A. Zimran, Effect of enzyme replacement therapy on gammopathies in Gaucher disease, Blood Cells Mol. Dis. 32 (2004) 214–217.
[135] A. Shiran, B. Brenner, A. Laor, I. Tatarsky, Increased risk of cancer in patients with Gaucher disease, Cancer 72 (1993) 219–224.
[136] B.E. Rosenbloom, N.J. Weinreb, A. Zimran, K.A. Kacena, J. Charrow, E. Ward, Gaucher disease and cancer incidence: a study from the Gaucher registry, Blood 105 (2005) 4569–4572.
[137] A. Zimran, I. Liphshitz, M. Barchana, A. Abrahamov, D. Elstein, Incidence of malignancies among patients with type I Gaucher disease from a single referral clinic, Blood Cells Mol. Dis. 34 (2005) 197–200.
[138] M. de Fost, S. Vom Dahl, G.J. Weverling, N. Brill, S. Brett, D. Haussinger, C.E. Hollak, Increased incidence of cancer in adult Gaucher disease in Western Europe, Blood Cells Mol. Dis. 36 (2006) 53–58.
[139] O. Landgren, I. Turesson, G. Gridley, N.E. Caporaso, Risk of malignant disease among 1525 adult male US Veterans with Gaucher disease, Arch. Intern. Med. 167 (2007) 1189–1194.
[140] N.J. Weinreb, H.C. Andersson, M. Banikazemi, J. Barranger, E. Beutler, J. Charrow, G.A. Grabowski, C.E. Hollak, P. Kaplan, H. Mankin, P.K. Mistry, B.E. Rosenbloom, S. Vom Dahl, A. Zimran, Prevalence of type 1 Gaucher disease in the United States, Arch. Intern. Med. 168 (2008) 326–327 author reply 327–328.
[141] T.H. Taddei, K.A. Kacena, M. Yang, R. Yang, A. Malhotra, M. Boxer, K.A. Aleck, G. Rennert, G.M. Pastores, P.K. Mistry, The underrecognized progressive nature of N370S Gaucher disease and assessment of cancer risk in 403 patients, Am. J. Hematol. 84 (2009) 208–214.
[142] M. Arends, L. van Dussen, M. Biegstraaten, C.E. Hollak, Malignancies and monoclonal gammopathy in Gaucher disease; a systematic review of the literature, Br. J. Haematol. 161 (2013) 832–842.
[143] M. Biegstraaten, I.N. van Schaik, J.M. Aerts, M. Langeveld, M.M. Mannens, L.J. Bour, E. Sidransky, N. Tayebi, E. Fitzgibbon, C.E. Hollak, A monozygotic twin pair with highly discordant Gaucher phenotypes, Blood Cells Mol. Dis. 46 (2011) 39–41.
[144] D. Amato, T. Stachiw, J.T. Clarke, G.E. Rivard, Gaucher disease: variability in phenotype among siblings, J. Inherit. Metab. Dis. 27 (2004) 659–669.
[145] E. Sidransky, Gaucher disease: complexity in a "simple" disorder, Mol. Genet. Metab. 83 (2004) 6–15.
[146] C.K. Zhang, P.B. Stein, J. Liu, Z. Wang, R. Yang, J.H. Cho, P.K. Gregersen, J.M. Aerts, H. Zhao, G.M. Pastores, P.K. Mistry, Genome-wide association study of N370S homozygous Gaucher disease reveals the candidacy of CLN8 gene as a genetic modifier contributing to extreme phenotypic variation, Am. J. Hematol. 87 (2012) 377–383.
[147] S.M. Lo, M. Choi, J. Liu, D. Jain, R.G. Boot, W.W. Kallemeijn, J.M. Aerts, F. Pashankar, G.M. Kupfer, S. Mane, R.P. Lifton, P.K. Mistry, Phenotype diversity in type 1 Gaucher disease: discovering the genetic basis of Gaucher disease/hematologic malignancy phenotype by individual genome analysis, Blood 119 (2012) 4731–4740.
[148] Y. Shoenfeld, L.A. Gallant, M. Shaklai, E. Livni, M. Djaldetti, J. Pinkhas, Gaucher's disease: a disease with chronic stimulation of the immune system, Arch. Pathol. Lab. Med. 106 (1982) 388–391.
[149] J.A. Castaneda, M.J. Lim, J.D. Cooper, D.A. Pearce, Immune system irregularities in lysosomal storage disorders, Acta Neuropathol. 115 (2008) 159–174.
[150] R.G. Boot, M. Verhoek, M. de Fost, C.E. Hollak, M. Maas, B. Bleijlevens, M.J. van Breemen, M. van Meurs, L.A. Boven, J.D. Laman, M.T. Moran, T.M. Cox, J.M. Aerts, Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention, Blood 103 (2004) 33–39.
[151] V. Barak, M. Acker, B. Nisman, I. Kalickman, A. Abrahamov, A. Zimran, S. Yatziv, Cytokines in Gaucher's disease, Eur. Cytokine Netw. 10 (1999) 205–210.
[152] C.E. Hollak, L. Evers, J.M. Aerts, M.H. van Oers, Elevated levels of M-CSF, sCD14 and IL8 in type 1 Gaucher disease, Blood Cells Mol. Dis. 23 (1997) 201–212.
[153] H. Michelakakis, C. Spanou, A. Kondyli, E. Dimitriou, S. Van Weely, C.E. Hollak, M.H. Van Oers, J.M. Aerts, Plasma tumor necrosis factor-a (TNF-a) levels in Gaucher disease, Biochim. Biophys. Acta 1317 (1996) 219–222.
[154] M.J. Allen, B.J. Myer, A.M. Khokher, N. Rushton, T.M. Cox, Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: increased release of interleukin-6 and interleukin-10, QJM 90 (1997) 19–25.
[155] C. Braudeau, J. Graveleau, M. Rimbert, A. Neel, M. Hamidou, B. Grosbois, A. Besancon, S. Giraudet, C. Terrien, R. Josien, A. Masseau, Altered innate function of plasmacytoid dendritic cells restored by enzyme replacement therapy in Gaucher disease, Blood Cells Mol. Dis. 50 (2013) 281–288.
[156] L.A. Boven, M. van Meurs, R.G. Boot, A. Mehta, L. Boon, J.M. Aerts, J.D. Laman, Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages, Am. J. Clin. Pathol. 122 (2004) 359–369.
[157] Y. Burstein, V. Zakuth, G. Rechavi, Z. Spirer, Abnormalities of cellular immunity and natural killer cells in Gaucher's disease, J. Clin. Lab. Immunol. 23 (1987) 149–151.
[158] I. Micheva, T. Marinakis, C. Repa, A. Kouraklis-Symeonidis, V. Vlacha, N. Anagnostopoulos, N. Zoumbos, A. Symeonidis, Dendritic cells in patients with type I Gaucher disease are decreased in number but functionally normal, Blood Cells Mol. Dis. 36 (2006) 298–307.
[159] P.J. Brennan, R.V. Tatituri, C. Heiss, G.F. Watts, F.F. Hsu, N. Veerapen, L.R. Cox, P. Azadi, G.S. Besra, M.B. Brenner, Activation of iNKT cells by a distinct constituent of the endogenous glucosylceramide fraction, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111 (2014) 13433–13438.
[160] P.J. Brennan, R.V. Tatituri, M. Brigl, E.Y. Kim, A. Tuli, J.P. Sanderson, S.D. Gadola, F.F. Hsu, G.S. Besra, M.B. Brenner, Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals, Nat. Immunol. 12 (2011) 1202–1211.
[161] S. Nair, C.S. Boddupalli, R. Verma, J. Liu, R. Yang, G.M. Pastores, P.K. Mistry, M.V. Dhodapkar, Type II NKT-TFH cells against Gaucher lipids regulate B-cell immunity and inflammation, Blood 125 (2015) 1256–1271.
[162] A. Balreira, L. Lacerda, C.S. Miranda, F.A. Arosa, Evidence for a link between sphingolipid metabolism and expression of CD1d and MHC-class II: monocytes from Gaucher disease patients as a model, Br. J. Haematol. 129 (2005) 667–676.
[163] A. Balreira, M. Cavallari, M.C. Sa Miranda, F.A. Arosa, Uncoupling between CD1d upregulation induced by retinoic acid and conduritol-B-epoxide and iNKT cell responsiveness, Immunobiology 215 (2010) 505–513.
[164] H. Mizukami, Y. Mi, R. Wada, M. Kono, T. Yamashita, Y. Liu, N. Werth, R. Sandhoff, K. Sandhoff, R.L. Proia, Systemic inflammation in glucocerebrosidase-deficient mice with minimal glucosylceramide storage, J. Clin. Investig. 109 (2002) 1215–1221.
[165] M.K. Pandey, R. Rani, W. Zhang, K. Setchell, G.A. Grabowski, Immunological cell type characterization and Th1-Th17 cytokine production in a mouse model of Gaucher disease, Mol. Genet. Metab. 106 (2012) 310–322.
[166] Y.H. Xu, L. Jia, B. Quinn, M. Zamzow, K. Stringer, B. Aronow, Y. Sun, W. Zhang, K.D. Setchell, G.A. Grabowski, Global gene expression profile progression in Gaucher disease mouse models, BMC Genomics 12 (2011) 20.
[167] Y. Kacher, A.H. Futerman, Impaired IL-10 transcription and release in animal models of Gaucher disease macrophages, Blood Cells Mol. Dis. 43 (2009) 134–137.
[168] J. Liu, S. Halene, M. Yang, J. Iqbal, R. Yang, W.Z. Mehal, W.L. Chuang, D. Jain, T. Yuen, L. Sun, M. Zaidi, P.K. Mistry, Gaucher disease gene GBA functions in immune regulation, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109 (2012) 10018–10023.
[169] E.V. Pavlova, S.Z. Wang, J. Archer, N. Dekker, J.M. Aerts, S. Karlsson, T.M. Cox, B cell lymphoma and myeloma in murine Gaucher's disease, J. Pathol. 231 (2013) 88–97.
[170] E.V. Pavlova, J. Archer, S. Wang, N. Dekker, J.M. Aerts, S. Karlsson, T.M. Cox, Inhibition of UDP-glucosylceramide synthase in mice prevents Gaucher disease-associated B-cell malignancy, J. Pathol. 235 (2015) 113–124.
[171] N.L. Marsh, P.M. Elias, W.M. Holleran, Glucosylceramides stimulate murine epidermal hyperproliferation, J. Clin. Investig. 95 (1995) 2903–2909.
[172] S.C. Datta, N.S. Radin, Stimulation of liver growth and DNA synthesis by glucosylceramide, Lipids 23 (1988) 508–510.

Please cite this article in press as: L. Astudillo, et al., Glucosylceramidases and malignancies in mammals, Biochimie (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.11.009

ARTICLE IN PRESS



[173] J.A. Shayman, G.D. Deshmukh, S. Mahdiyoun, T.P. Thomas, D. Wu, F.S. Barcelon, N.S. Radin, Modulation of renal epithelial cell growth by glucosylceramide. Association with protein kinase C, sphingosine, and diacylglycerol, J. Biol. Chem. 266 (1991) 22968–22974.
[174] T.A. Natoli, L.A. Smith, K.A. Rogers, B. Wang, S. Komarnitsky, Y. Budman, A. Belenky, N.O. Bukanov, W.R. Dackowski, H. Husson, R.J. Russo, J.A. Shayman, S.R. Ledbetter, J.P. Leonard, O. Ibraghimov-Beskrovnaya, Inhibition of glucosylceramide accumulation results in effective blockade of polycystic kidney disease in mouse models, Nat. Med. 16 (2010) 788–792.
[175] S. Chatterjee, W.Y. Shi, P. Wilson, A. Mazumdar, Role of lactosylceramide and MAP kinase in the proliferation of proximal tubular cells in human polycystic kidney disease, J. Lipid Res. 37 (1996) 1334–1344.
[176] F. Guan, K. Handa, S.I. Hakomori, Specific glycosphingolipids mediate epithelial-to-mesenchymal transition of human and mouse epithelial cell lines, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106 (2009) 7461–7466.
[177] T. Levade, N. Andrieu-Abadie, O. Micheau, P. Legembre, B. Ségui, Sphingolipids modulate the epithelial-mesenchymal transition in cancer, Cell Death Discov. 1 (2015) 15001, http://dx.doi.org/10.1038/cddiscovery.2015.1 published online 12 October 2015.
[178] H. Morjani, N. Aouali, R. Belhoussine, R.J. Veldman, T. Levade, M. Manfait, Elevation of glucosylceramide in multidrug-resistant cancer cells and accumulation in cytoplasmic droplets, Int. J. Cancer 94 (2001) 157–165.
[179] C. Swanton, M. Marani, O. Pardo, P.H. Warne, G. Kelly, E. Sahai, F. Elustondo, J. Chang, J. Temple, A.A. Ahmed, J.D. Brenton, J. Downward, B. Nicke, Regulators of mitotic arrest and ceramide metabolism are determinants of sensitivity to paclitaxel and other chemotherapeutic drugs, Cancer Cell 11 (2007) 498–512.
[180] B.M. Barth, S.J. Gustafson, M.M. Young, T.E. Fox, S.S. Shanmugavelandy, J.M. Kaiser, M.C. Cabot, M. Kester, T.B. Kuhn, Inhibition of NADPH oxidase by glucosylceramide confers chemoresistance, Cancer Biol. Ther. 10 (2010) 1126–1136.
[181] B.M. Barth, S.S. Shanmugavelandy, D.M. Tacelosky, M. Kester, S.A. Morad, M.C. Cabot, Gaucher's disease and cancer: a sphingolipid perspective, Crit. Rev. Oncog. 18 (2013) 221–234.
[182] K. Kitatani, K. Sheldon, V. Rajagopalan, V. Anelli, R.W. Jenkins, Y. Sun, G.A. Grabowski, L.M. Obeid, Y.A. Hannun, Involvement of acid beta-glucosidase 1 in the salvage pathway of ceramide formation, J. Biol. Chem. 284 (2009) 12972–12978.
[183] M. Sumitomo, M. Ohba, J. Asakuma, T. Asano, T. Kuroki, T. Asano, M. Hayakawa, Protein kinase Cdelta amplifies ceramide formation via mitochondrial signaling in prostate cancer cells, J. Clin. Investig. 109 (2002) 827–836.
[184] K. Kitatani, K. Sheldon, V. Anelli, R.W. Jenkins, Y. Sun, G.A. Grabowski, L.M. Obeid, Y.A. Hannun, Acid beta-glucosidase 1 counteracts p38delta-dependent induction of interleukin-6: possible role for ceramide as an anti-inflammatory lipid, J. Biol. Chem. 284 (2009) 12979–12988.
[185] S.P. Sardi, S.H. Cheng, L.S. Shihabuddin, Gaucher-related synucleinopathies: the examination of sporadic neurodegeneration from a rare (disease) angle, Prog. Neurobiol. 125 (2015) 47–62.
[186] M.J. Devine, H. Plun-Favreau, N.W. Wood, Parkinson's disease and cancer: two wars, one front, Nat. Rev. Cancer 11 (2011) 812–823.
[187] R. Liu, X. Gao, Y. Lu, H. Chen, Meta-analysis of the relationship between Parkinson disease and melanoma, Neurology 76 (2011) 2002–2009.
[188] Y. Matsuo, T. Kamitani, Parkinson's disease-related protein, alpha-synuclein, in malignant melanoma, PLoS One 5 (2010) e10481.
[189] E. Israeli, E. Yakunin, Y. Zarbiv, A. Hacohen-Solovich, H. Kisos, V. Loeb, M. Lichtenstein, T. Ben-Gedalya, O. Sabag, E. Pikarsky, H. Lorberboum-Galski, R. Sharon, alpha-Synuclein expression selectively affects tumorigenesis in mice modeling Parkinson's disease, PLoS One 6 (2011) e19622.
[190] S.C. Sorli, S. Colie, V. Albinet, A. Dubrac, C. Touriol, N. Guilbaud, C. Bedia, G. Fabrias, J. Casas, B. Segui, T. Levade, N. Andrieu-Abadie, The nonlysosomal beta-glucosidase GBA2 promotes endoplasmic reticulum stress and impairs tumorigenicity of human melanoma cells, Faseb J. 27 (2) (2013 Feb) 489–498.
[191] K. Yahata, K. Mori, H. Arai, S. Koide, Y. Ogawa, M. Mukoyama, A. Sugawara, S. Ozaki, I. Tanaka, Y. Nabeshima, K. Nakao, Molecular cloning and expression of a novel klotho-related protein, J. Mol. Med. Berl. 78 (2000) 389–394.
[192] H.J. Lee, K.T. Nam, H.S. Park, M.A. Kim, B.J. Lafleur, H. Aburatani, H.K. Yang, W.H. Kim, J.R. Goldenring, Gene expression profiling of metaplastic lineages identifies CDH17 as a prognostic marker in early stage gastric cancer, Gastroenterology 139 (2010) 213–225 e213.

Please cite this article in press as: L. Astudillo, et al., Glucosylceramidases and malignancies in mammals, Biochimie (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.11.009

J Inherit Metab Dis (2015) 38:65–76
DOI 10.1007/s10545-014-9736-1

COMPLEX LIPIDS

# Human genetic disorders of sphingolipid biosynthesis

**Leonardo Astudillo · Frédérique Sabourdy · Nicole Therville · Heiko Bode · Bruno Ségui · Nathalie Andrieu-Abadie · Thorsten Hornemann · Thierry Levade**

Received: 6 May 2014 / Accepted: 12 June 2014 / Published online: 21 August 2014
© SSIEM 2014

**Abstract** Monogenic defects of sphingolipid biosynthesis have been recently identified in human patients. These enzyme deficiencies affect the synthesis of sphingolipid precursors, ceramides or complex glycosphingolipids. They are transmitted as autosomal recessive or dominant traits, and their resulting phenotypes often replicate the abnormalities seen in murine models deficient for the corresponding enzymes. In quite good agreement with the known critical roles of sphingolipids in cells from the nervous system and the epidermis, these genetic defects clinically manifest as neurological disorders, including paraplegia, epilepsy or peripheral neuropathies, or present with ichthyosis. The present review summarizes the genetic alterations, biochemical changes and clinical symptoms of this new group of inherited metabolic disorders. Hypotheses regarding the molecular pathophysiology and potential treatments of these diseases are also discussed.

Communicated by: Jean-Marie Saudubray

Presented at the Workshop "Diagnostic approach, and classification of IEM affecting the synthesis and catabolism of complex lipids" in Paris, France, June 14-15, 2013.

L. Astudillo · F. Sabourdy · N. Therville · B. Ségui · N. Andrieu-Abadie · T. Levade
Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR1037, Team n 4, CHU Rangueil, BP 84225, 31432 Toulouse, France

L. Astudillo · F. Sabourdy · N. Therville · B. Ségui · N. Andrieu-Abadie · T. Levade
Equipe Labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer 2013, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Université de Toulouse, Toulouse, France

L. Astudillo
Service de Médecine Interne, CHU Purpan, Toulouse, France

F. Sabourdy · T. Levade (✉)
Laboratoire de Biochimie Métabolique, Institut Fédératif de Biologie, CHU Purpan, Toulouse, France
e-mail: thierry.levade@inserm.fr

H. Bode · T. Hornemann
Institute for Clinical Chemistry, University Hospital Zurich and Center for Integrative Human Physiology, University of Zurich, Zurich, Switzerland

**Abbreviations**

| | |
|---|---|
| ARCI | Autosomal recessive congenital ichthyosis |
| deoxyCer | 1-deoxy-ceramide |
| deoxySa | 1-deoxy-sphinganine |
| deoxymetSa | 1-deoxymethyl-sphinganine |
| deoxySL | 1-deoxy-sphingolipid |
| HSAN | Hereditary sensory and autonomic neuropathy |
| MRI | Magnetic resonance imaging |
| S1P | Sphingosine 1-phosphate |
| SL | Sphingolipid |
| SPT | Serine-palmitoyltransferase |

## Introduction

Sphingolipids (SLs) are ubiquitous lipids found in all mammalian cell membranes, including myelin, as well as in the plasma lipoproteins. They form a very diverse family of lipid molecules, the backbone of which is ceramide, i.e., a long chain sphingoid base that can be N-acylated by a variety of fatty acids. Addition of a hydrophilic headgroup at the C1 position of ceramide results in the formation of three major complex SLs, the ubiquitous sphingophospholipid sphingomyelin, the myelin-specific galactosphingolipids, and the vast group of glycosphingolipids, including gangliosides (see Fig. 1). During the last 25 years, many SL molecules

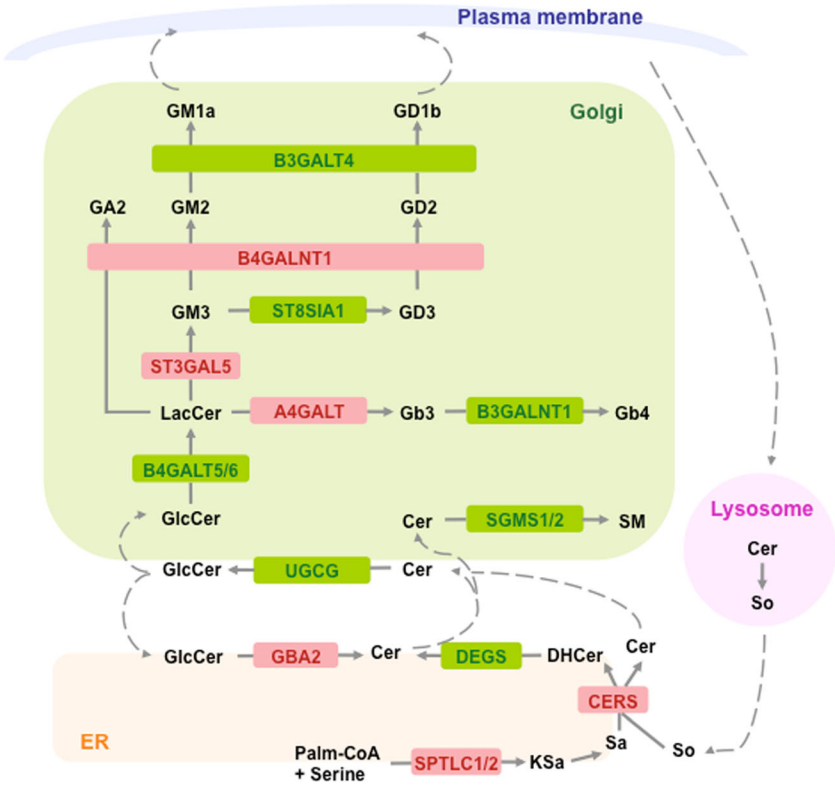


**Fig. 1** Schematic view of the subcellular compartmentalization of ceramide and glycosphingolipid biosynthesis. The de novo pathway for the production of ceramide occurs in the endoplasmic reticulum and starts by the condensation of serine and palmitoyl-CoA, to generate ketosphinganine, which is then reduced to sphinganine. Then, the sphingoid base is acylated by ceramide synthases to form dihydroceramide. A final desaturation reaction produces ceramide. The sphingosine that is released by the action of ceramidases (e.g., lysosomal ceramidase) on the ceramide derived from the degradation of complex SLs can also be acylated by ceramide synthases. Transport of ceramide to the Golgi is followed by its conversion either to sphingomyelin or glucosylceramide. Stepwise addition of distinct sugar or sialic acid molecules leads to the synthesis of neutral glycolipids and gangliosides. (The conversion of glucosylceramide to ceramide by GBA2 is presented here as a potential pathway for producing ceramide in the endoplasmic reticulum.) The genes encoding the main enzymes discussed in the text are indicated in red (when mutations are known to cause human disease) or green (when no mutations are reported). Note that all metabolic pathways are not indicated here. For instance, the 2-hydroxylation of fatty acids prior to their incorporation into (dihydro)ceramide is not shown. Abbreviations: Cer, ceramide; DHCer, dihydroceramide; ER, endoplasmic reticulum; GlcCer, glucosylceramide; LacCer, lactosylceramide; KSa, ketosphinganine; Palm-CoA, palmitoyl-CoA; Sa, sphinganine; SM, sphingomyelin; So, sphingosine

have been recognized as critical regulators of numerous biological and physiological functions. Such roles are mediated by the fact that SLs are key structural membrane constituents and/or bioactive lipids or even second messengers. The importance of SLs in health and disease had actually been appreciated earlier through the study of lysosomal storage disorders. These metabolic diseases are characterized by inherited defects of SL degradation within the endosomal-lysosomal system (Futerman and van Meer 2004; Cox and Cachon-Gonzalez 2012). The resulting accumulation of undegraded SLs often manifests as severe neurodegenerative diseases, although some lysosomal SL storage disorders (also) present with visceral disturbances.

Very recently, a new group of monogenic disorders have emerged that are caused by mutations in the genes encoding enzymes of SL biosynthesis. Together with the phenotypic changes seen in mouse models harboring a disruption in the corresponding genes (for recent reviews on murine models of genetic defects of SL metabolism, see (Sabourdy et al 2008; Xu et al 2010)), these new human conditions highlight the biological functions of SLs. Here, the clinical presentation of this newly identified class of human metabolic defects is reviewed. Possible pathogenic mechanisms linking abnormal SL synthesis, tissue dysfunction and symptoms are discussed.

## Biosynthesis defects with neurological involvement

### Peripheral neuropathy

One of the best documented SL synthesis disorder is a rare inherited sensory and autonomic neuropathy (HSAN), which is characterized by a defect in the very first step of SL metabolism. HSANs are a group of clinically and genetically heterogeneous peripheral neuropathies. They can be subdivided into five clinical entities, which are all characterized by the progressive loss of pain and temperature sensation spreading from the distal limbs. The most common HSAN form is type I (HSAN1, OMIM#605712 and #605713), which in contrast to the other HSANs shows an

autosomal dominant trait of inheritance. Clinically, it can be discriminated from the other subtypes by a late onset (typically between the 2nd and 4th decade), a slow progression, characteristic tissue complications like plantar ulcers predominantly affecting the lower limbs and lancinating pain attacks (Dyck 1993).

Mutations in five different genes (SPTLC1, SPTLC2, ATL1, RAB7A and DNMT1) have been linked to HSAN1 (Rotthier et al 2012). However, the majority of HSAN1 mutations were found in the genes SPTLC1 and SPTLC2, which encode for two subunits of the enzyme serine palmitoyltransferase (SPT). Mutations in SPTLC1 were the first which could be conclusively linked to HSAN1 (Bejaoui et al 2001; Dawkins et al 2001), and genetic screenings of HSAN patients in the UK confirmed that mutations in SPTLC1 are also the most frequent cause for HSAN1 (Davidson et al 2012).

Typically, SPT catalyzes the condensation of palmitoyl-CoA and L-serine which is the first and rate limiting step in the de novo synthesis of SLs (Hanada 2003). A common feature of all HSAN1 mutants is a shift in the substrate specificity of SPT. Besides L-serine, the mutant SPT can also metabolize L-alanine and glycine as alternative substrates. This forms a novel category of atypical 1-deoxy-ceramides (deoxyCer). The condensation of palmitoyl-CoA with L-alanine and glycine results in the formation of 1-deoxy-sphinganine (deoxySa) and 1-desoxymethyl-sphinganine (deoxymetSa), respectively. In contrast to regular ceramides, deoxyCer are devoid of the C1 hydroxyl group which abrogates their conversion into complex SLs but also their degradation by the canonical catabolic pathway (Zitomer et al 2009; Penno et al 2010). DeoxyCer are neurotoxic and interfere with cytoskeletal dynamics (Cuadros et al 2000; Zuellig et al 2014). Addition of deoxySa to primary sensory neurons prevented neurite formation in a dose-dependent manner while differentiated neurons showed a dose-dependent neurite retraction and a destruction of cytoskeletal structures in the presence of deoxySa (Penno et al 2010). Elevated deoxyCer levels are consistently found in plasma of HSAN1 patients and correlate with the disease severity (Laurá et al 2012). Up to now, seven mutations in SPTLC1 (SPTLC1 p.C133W, p.C133Y, p.C133R, p.V144D, p.A352V, p.S331F, and p.S331Y) and five mutations in SPTLC2 (SPTLC2 p.V359M, p.G382V, p.T409M, p.I504F, and p.A182P) were linked to HSAN1 (Bejaoui et al 2001; Dawkins et al 2001; Rautenstrauss et al 2009; Rotthier et al 2009; Rotthier et al 2010; Auer-Grumbach et al 2013; Murphy et al 2013). Further mutations and polymorphisms in SPT were reported but are not yet conclusively linked to a disease (e.g., SPTLC1 p.A310G) (Davidson et al 2012).

Typically, HSAN1 is characterized by a late disease onset, slow progression and primarily sensory deficits. However, there is a considerable clinical heterogeneity in the time of onset and the severity of the symptoms, even for patients with the same mutation or within the same family.

In particular, patients with mutations at position SPTLC1 p.S331 present with a very severe phenotype. In this variant, first symptoms are already observed in early childhood and comprise considerable motor involvement, global hypotrophy, developmental retardation, vocal cord paresis, anhydrosis, juvenile cataracts, and severe respiratory problems. Up to now four patients with mutations in SPTLC1 p.S331 were reported Rotthier et al (2009); Rotthier et al 2011; Auer-Grumbach et al 2013; Suh et al 2014). In three cases, a Ser331Phe substitution (p.S331F) was found (Huehne et al 2008; Rotthier et al 2009; Rotthier et al 2011; Suh et al 2014) and in one case a S331Y exchange (Auer-Grumbach et al 2013). All mutations occurred de novo and were absent in unaffected family members.

Besides symptomatic interventions like ortheses, orthopedic footwear, and optimized wound care to treat chronic ulcers and prevent osteomyelitis, there is currently no treatment for HSAN1 available. However, it was shown that the pathological deoxyCer formation can be efficiently suppressed by an oral supplementation with L-serine (Garofalo et al 2011). HSAN1 mice which received an L-serine enriched diet (10 % w/w) showed a reduction of plasma deoxyCer levels by up to 95 % and did not develop neurological symptoms until the end of the study (20 months) (Garofalo et al 2011). This beneficial effect was further corroborated in a pilot study with 14 HSAN1 patients who received L-serine either at low (200 mg/kg/d) or a high (400 mg/kg/d) dose for ten weeks (Garofalo et al 2011). Within six weeks the deoxyCer levels normalized in both groups and increased again after the termination of the treatment. Neurological improvements were not systematically assessed during this first study. However, patient testimonies reported an improved sensation (hand tingling, increased menstrual cramps), improved wound healing, and also improvements in the autonomous functions (anhydrosis). The efficacy of an oral L-serine supplementation as a treatment for HSAN1 is currently further tested in a placebo controlled two-year clinical study which started in July 2013 (http://clinicaltrials.gov/show/NCT01733407).

## Epilepsy

Deficient activity of two enzymes of SL synthesis results in a clinical picture dominated by epilepsy: GM3 synthase and ceramide synthase 2. Of note, defects of the GM2/GD2 synthase also lead to seizures (see below Paraplegia and ataxia).

### *ST3GAL5 mutations*

The Amish epilepsy syndrome (OMIM#604402) is an autosomal recessive infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome first described in eight children from two families with a common ancestor of the Old Order Amish population (Simpson et al 2004). The first symptoms, noted between the ages of 2 weeks and 3 months, consisted of severe irritability along with poor feeding, vomiting and failure to thrive. Seizures started within the first year of life, with generalized tonic-clonic seizures but also other types of seizures. Concomitantly, a profound

developmental stagnation with intellectual disability was noted. Non-purposeful arm movements have a choreoathetoid component. Children are hypotonic with reduced or absent upper limb reflexes and deterioration of visual function with some optic atrophy occurs (Farukhi et al 2006). Electroencephalograms ultimately showed multifocal epileptiform discharges superimposed on diffuse slow background activity. Brain magnetic resonance imaging (MRI) initially showed no structural abnormalities, but studies at older ages showed diffuse atrophy. However, in some patients, MRI showed occipital white matter abnormalities and significant cortical atrophy, mainly in the occipital visual cortex (Fragaki et al 2013).

The severity of the disease varies significantly; one patient was reported to have deafness (Fragaki et al 2013). Patients also present with abnormally pigmented skin (see section Biosynthesis defects with skin involvement) (Wang et al 2013).

Mutations of ST3GAL5 are also responsible for an autosomal recessive neurocutaneous syndrome combining hyper and hypo-pigmented skin maculae called 'salt-and-pepper' syndrome, facial dysmorphism (midface hypoplasia, microcephalia, prominent lower face), scoliosis associated with severe intellectual disability, seizures, choreoathetosis, spasticity, and abnormal electrocardiogram with nonspecific conduction changes (Boccuto et al 2013).

The pathogenesis of infantile-onset epilepsy syndrome is a nonsense mutation in exon 6 of ST3GAL5 (SIAT9) responsible for a loss of function of GM3 synthase. This mutation affects a domain between two sialyl motives of the protein and abolishes enzyme activity. As a consequence, the patient's plasma showed a lack of GM3 and its downstream biosynthetic derivatives, and a reciprocal increased level of lactosylceramide as well as intermediates of the globoside (Gb4) and paragloboside pathways. Dysfunction of the respiratory chain and increased apoptotic death have also been described in patient's fibroblasts (Fragaki et al 2013). In addition, GM3 synthase-deficient fibroblasts exhibit reduced proliferation and migration in response to EGF (Liu et al 2008), an observation consistent with the known ability of GM3 to modulate signaling through multiple membrane receptors.

The 'salt-and-pepper' syndrome was due to a mutation in exon 7 of ST3GAL5 that renders the mutant protein unstable (Boccuto et al 2013). Alterations of the glycolipid composition in patient's fibroblasts were associated with a shift toward greater sialylation of O- and N-glycans of glycoproteins. Comparable biochemical changes were seen in zebrafish embryos after St3gal5 knockdown; these morphants did not show a particular phenotype but increased apoptosis of neural crest cells (Boccuto et al 2013).

Mouse models of disrupted GM3 synthase have been described. Mutant mice exhibit impaired neuropsychological behavior, display enhanced ligand-induced insulin receptor phosphorylation with increased insulin sensitivity and are protected from high-fat diet-induced insulin resistance (Yamashita et al 2003; Niimi et al 2011). Another model of St3gal5 knockout mice shows complete hearing loss due to selective degeneration of the Corti organ (Yoshikawa et al 2009).

### *CERS2 mutations*

Ceramides are essential and ubiquitous components of the eukaryotic membranes. The enzymes involved in the synthesis of all major ceramide species have recently been identified. Ceramide synthases produce dihydroceramide from sphinganine by N-acylation of the sphingoid base. There are six human ceramide synthases, encoded by the CERS genes, that can be distinguished according to their tissue specificity and the chain length of their preferentially used acyl-CoA (Pewzner-Jung et al 2006; Teufel et al 2009; Levy and Futerman 2010; Mullen et al 2012). Very recently, a de novo heterozygous deletion of CERS2 has been reported in an adult patient with progressive myoclonic epilepsy (OMIM#606920) (Mosbech et al 2014). This patient presented with generalized tonic-clonic seizures since the age of 10, but also with ataxia, dysarthria, and photosensitivity. Despite a 50 % reduction of CERS2 transcript, protein and enzyme activity, patient's fibroblasts showed decreased very long chain (but increased long chain) ceramides. CerS2 is a ubiquitously expressed ceramide synthase. Homozygous disruption of Cers2 in mice results both to a hepatopathy and an encephalopathy (Imgrund et al 2009; Pewzner-Jung et al 2010a, b; Ben-David et al 2011). Whether the lipid alterations seen in the patient's fibroblasts also occur in neurons, and whether the substrate (sphingoid bases) and/or products of CerS2 are disease-causing remain to be investigated.

## Paraplegia and ataxia

Three genetic defects affecting SL metabolism and leading to spastic paraplegia and/or ataxia have been described.

### *B4GALNT1 mutations*

Such mutations account for an autosomal recessive form of a spastic paraplegia, SPG26 (OMIM#601873). The clinical picture is a progressive weakness and spasticity affecting the lower and, in some cases, the upper extremities. Gait difficulties appear from 2 to 19 years of age. The severity is variable. Reflexes are increased with the presence of Babinski sign. The disease is accompanied by a moderate cognitive impairment, cerebellar signs, sensory neuropathy, pseudobulbar dysarthria, extrapyramidal signs, emotional lability, and psychiatric symptoms. Some patients present seizure activity, bladder disturbances, scoliosis, cataracts, pes cavus, and strabismus. EMG shows an axonal sensory or motor neuropathy in many patients. Brain MRI remains normal or, after long disease durations, shows cortical atrophy, subcortical atrophy and/or white matter hyperintensities on FLAIR sequence (Wilkinson et al 2005; Boukhris et al 2013).

The B4GALNT1 gene encodes beta-1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase 1, that synthesizes the GM2 and GD2 gangliosides (see Fig. 1). Different mutations have been reported in European and North African patients (see Table 1), which are expected to lead to the accumulation of at least G[M/D/T]3 gangliosides. As a matter of fact, patients' fibroblasts lacked GM2 and accumulated GM3 (Harlalka et al 2013). Whether the disease manifestations are related to these changes or to the reduction of the major brain complex gangliosides is still unknown.

Mice lacking GM2/GD2 synthase activity have been generated (Takamiya et al 1996; Sheikh et al 1999; Chiavegatto et al 2000). These animals do not have major histological or behavioral abnormalities; nonetheless, gait disturbance and tremor have been reported. The higher brain levels of GM3 and GD3 might compensate for the lack of complex gangliosides.

*GBA2 mutations*

Mutations of the GBA2 gene were initially reported in ten Tunisian patients presenting with autosomal recessive cerebellar ataxia (OMIM#609471) (Hammer et al 2013). The clinical presentation is a progressive cerebellar ataxia with onset during childhood or early adulthood. Some patients have head tremor. Pyramidal syndrome is observed with spasticity of the lower limbs. A more or less severe axonal sensory or sensory-motor neuropathy was also observed. In most cases, cerebral and spinal MRI is normal except one case with a global atrophy. All the patients described were homozygous for nonsense mutations, responsible for a severely truncated protein, or a substitution (p.R873H) within a conserved region.

Three more patients from a consanguinous Cypriot family were recently described (Votsi et al 2014). Their clinical presentation was dominated by a spasticity of the lower limbs with gait disturbances. Pes cavus and tendon contractures along with spontaneous extensor plantar response were noted. Pyramidal signs were present associated with nystagmus at the initial stage. Spasticity progressed to the upper limbs, truncal and neck muscles with weakness in the lower limbs, along with spastic dysarthria, dysphagia, and urinary incontinence. Patients became wheelchair bound within 20–25 years from disease onset. Cerebellar symptoms were present and a mild cognitive impairment appeared, together with hearing loss and oculomotor apraxia at the advanced stages. MRI found marked cerebellar atrophy in the three patients. Electrophysiologic evaluation found minimal sensory axonal neuropathy at advanced stages of the disease. The missense mutation (p. D594H) that was identified alters a highly conserved amino acid.

At variance with the above cases, some patients with GBA2 defects present with a hereditary spastic paraplegia (SPG46). Eleven patients of four families (Tunisian, Belgian, Turkish, and Portuguese) were described with a spastic paraplegia that started in infancy or childhood (Martin et al 2013). Cerebellar ataxia, cataract, and mild mental impairment were also present in all individuals. Some patients presented hearing loss, axonal neuropathy, and bilateral testicular hypotrophy associated with severe spermatozoid head abnormalities. A further family with a homoallelic GBA2 mutation (p. G683R) resulting in spasticity, mild cerebellar signs, and moderate eyelid ptosis has just been described (Citterio et al 2014).

Inactivation of GBA2 in the zebrafish induces morphological phenotypes with abnormal embryonic development of caudal region and motility defects, as well as impaired outgrowth of spinal neuron axons (Martin et al 2013). In mice, disruption of the Gba2 gene is responsible for globozoospermia and male infertility (Yildiz et al 2006), as observed in some of the patients described above, but no neurological symptoms or reduction in lifespan. How (and which) perturbations of SL metabolism explain the cellular pathology is still unknown.

For clinical practice, diagnosis of GBA2-related autosomal recessive cerebellar ataxia or spastic paraplegia could be first based on determination of GBA2 enzymatic activity as fluorogenic substrate-based assays are available.

*FA2H mutations*

FA2H encodes for an enzyme that introduces a hydroxyl group at the C2-position of fatty acids. The corresponding hydroxylated fatty acyl-CoAs are incorporated by ceramide synthases (CerS) into SLs, especially but not exclusively myelin-specific SLs such as galactolipids (Hama 2010). Homozygous FA2H mutations are associated with a more or less rapidly progressive neurological disorder (OMIM#611026) characterized by white matter degeneration that may present with spastic paraplegia (SPG35), leukodystrophy or neurodegeneration associated with brain iron accumulation. The disease appears quite heterogenous. Clinical manifestations start after the age of 3, and include spastic paraparesis, gait disturbance, dystonia, and late mental deterioration. Some patients exhibit dysarthria, ataxia, dysmetria, and seizures. MRI of the brain has revealed bilateral T2 hyperintensity in the cerebral white matter, and hypointensity in the globus pallidus in those patients with iron deposition.

The reported mutations affect one of the two critical functional domains of the fatty acid 2-hydroxylase: a N-terminal cytochrome b5-like heme-binding domain and a C-terminal catalytic domain consisting of four transmembrane domains that anchor the enzyme into the ER membrane. There is no clear genotype–phenotype correlation. In good agreement with the phenotype observed in mouse models with disrupted Fa2h (Zoller et al 2008; Potter et al 2011), this human neurological disorder, which does not manifest before the age of 3, underlines the requirement of 2-hydroxygalactolipids not for

**Table 1** Human genetic disorders of sphingolipid biosynthesis

| Enzyme | Gene | Cytogenetic location | Inheritance | Mutations | Age of disease onset | Main symptoms | References |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Serine palmitoyltransferase subunit 1 (EC 2.3.1.50) | SPTLC1 | 9q22.31 | AD | p.C133Y, 133W, C133R, V144D, A310G*, A352V | >20 years | Hereditary sensory neuropathy type 1, distal sensory loss, foot ulcers, muscle weakness, variable distal motor involvement, hypotonia, cataract | (Dawkins et al 2001; Bejaoui et al 2002; Verhoeven et al 2004; Rotthier et al 2009; Davidson et al 2012; Auer-Grumbach et al 2013; Suh et al 2013) |
| | | | unknown (de novo) | S331F, S331Y | early childhood | | |
| Serine palmitoyltransferase subunit 2 (EC 2.3.1.50) | SPTLC2 | 14q24.3-q31 | AD unknown (de novo isolated cases) | p.A182P,V359M, G382V, T409M*, I505F | >20 years early childhood | Hereditary sensory neuropathy type 1 (see above) | (Rotthier et al 2010; Murphy et al 2013) |
| Ceramide synthase 2 (EC 2.3.1.24) | CERS2 | 1q21.3 | AD | large deletion | 10 years | Progressive myoclonic epilepsy | (Mosbech et al 2014) |
| Ceramide synthase 3 (EC 2.3.1.24) | CERS3 | 15q26.3 | AR | p.W15R, P173_K203del, contiguous gene deletion | at birth | Ichthyosis | (Eckl et al 2013; Radner et al 2013) |
| Non-lysosomal beta-glucosidase (EC 3.2.1.45) | GBA2 | 9p13.3 | AR | p.Y121X, W173X, R234X, R340X, T492Rfs, D594H, R630W, G683R, R873H | Infancy or childhood | Spastic paraplegia, ataxia | (Hammer et al 2013; Martin et al 2013; Citterio et al 2014; Votsi et al 2014) |
| GM3 synthase (EC 2.4.99.9) | ST3GAL5 (SIAT9) | 2p11.2 | AR | p.R288X, E355K | 2 weeks-3 months | Epilepsy | (Simpson et al 2004; Boccuto et al 2013; Fragaki et al 2013; Wang et al 2013) |
| GM2/GD2 synthase (EC 2.4.1.92) | B4GALNT1 | 12q13.3 | AR | p.L89Pfs, Q120X, P132Qfs, R228X, K284N, R300C, T307_V308dup, D433A, F439del, L487Tfs, R505H, c.838-2A>G | 2 to 19 years | Early onset spastic paraplegia, ataxia | (Fishman et al 1975; Boukhris et al 2013; Harlalka et al 2013; Wakil et al 2013) |
| Gb3 synthase (EC 2.4.1.228) | A4GALT | 22q13.2 | | p.L23fs, V34I, T68fs, F81del, C96Y, K97X, S97L, S100L, A101fs, I130fs, Q140X, Q140fs, Q140Wfs, W158X, W166X, Y169fs, M183K, M183fs, G187D, G187R, A219V, A219fs, I245fs P251S, P251L, R256fs W261X, P301fs, T324fs, c.470_496delins, c.1030insC | | p phenotype, Polyagglutination syndrome | (Furukawa et al 2000; Steffensen et al 2000; Koda et al 2002; Hellberg et al 2003; Yan et al 2003; Hellberg et al 2004; Hellberg et al 2008; Thuresson et al 2011; Wang et al 2011; Suchanowska et al 2012; Wei et al 2012; Liu et al 2013; Westman et al 2013) |
| | | | | p.Q211E | | NOR antigens | (Suchanowska et al 2012 |
| Gb4 synthase (EC 2.4.1.79) | B3GALNT1 | 3q26.1 | AR | p.R68X, R68fs, D150G, Y152X, D180Rfs, S200fs, E266A, G271R, W320X | | $P^K$ phenotype | (Hellberg et al 2002; Westman et al 2013) |

**Table 1** (continued)

| Enzyme | Gene | Cytogenetic location | Inheritance | Mutations | Age of disease onset | Main symptoms | References |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ceramide kinase-like | CERKL | 2q31.3 | AR | p.E53X, R106S, C125W, L140fs, K200X, M253fs, R257X, T260fs, C362X, c.238+1G>A, c.847C>T | 15-20 years | Retinitis pigmentosa | (Tuson et al 2004; Auslender et al 2007; Ali et al 2008; Avila-Fernandez et al 2008; Aleman et al 2009; Tang et al 2009; Littink et al 2010; Nishiguchi et al 2013) |
| Fatty acid 2-hydroxylase | FA2H | 16q23.1 | AR | p.D35Y, R53_I58del, S70L, L77R, D122Vfs, L130F, R154C, Y170X, Y170C, E205_S346del, E230K, R235C, F236S, P323L, P323Q, G326S, 28kb deletion, c.270+3A>T | 3-6 years | Spastic paraplegia, dystonia, dysarthria, ataxia | (Edvardson et al 2008; Dick et al 2010;Kruer et al 2010; Pierson et al 2012; Garone et al 2011; Tonelli et al 2012; Cao et al 2013; Rupps et al 2013Liao et al 2013; Donkervoort et al 2014) |

Impact of mutations at the protein level are indicated; however, when such effects of mutations are unclear, the nucleotide changes are indicated*, reported but not confirmed

Abbreviations: *AD*, autosomal dominant, *AR*, autosomal recessive

myelin formation but for maturation and/or long-term maintenance of myelin.

Whether early supplementation of the diet with 2-hydroxy fatty acids can represent a potential therapeutic strategy requires investigation.

## Retinitis

The CERKL (ceramide kinase-like) protein shares 29 % identity and 50 % similarity with human ceramide kinase (Tuson et al 2004), an enzyme that converts ceramide into ceramide 1-phosphate. CERKL mutations are associated with a group of inherited retinal dystrophies, which were first identified as retinitis pigmentosa from the RP26 family (Tuson et al 2004) and more recently as cone rod dystrophy (Aleman et al 2009) (OMIM#608381). The disease is characterized by primary dysfunction or loss of cone photoreceptors and then of rod photoreceptors. Patients present with a progressive loss of central vision, visual field constriction, and nyctalopia. Various degrees of severity can be observed even in the same family (Bayes et al 1998; Aleman et al 2009).

CERKL is mainly expressed in human retina, kidney, lung and pancreas. In murine retina, Cerkl is preferentially expressed in the ganglion cell layer, and to a lesser extent in photoreceptors and the inner nuclear layer (Tuson et al 2004; Garanto et al 2012). Although CERKL contains a conserved lipid kinase domain, its substrate is still unknown and all attempts to demonstrate its kinase activity have failed. However, CERKL seems undoubtedly linked to SL metabolism as a “knock-down” mouse model that only retains 35 % of Cerkl transcription showed an obvious decrease of the retinal SL content (Garanto et al 2013). While CERKL can bind glucosyl or galactosyl-cerebrosides and sphingomyelin, its precise role remains elusive.

There is no animal model perfectly mimicking the human phenotype and no full Cerkl knock-out could be engineered. A first mouse lacking exon 5 did not show any phenotype because the gene modification only affected some Cerkl isoforms (Graf et al 2008). The second mouse model lacked the proximal promoter and exon 1 (Garanto et al 2012). This led to a partial (65 %) reduction of Cerkl expression in retina. No morphological alterations of the retina could be observed, but cellular analyses revealed a retinal stress, characterized by gliosis and apoptosis. Moreover, alterations of the electroretinographic recordings underlined the functional alteration of the ganglion cell layer (Garanto et al 2012). These results did not perfectly fit with observations made in humans but suggested a protective role towards retinal neurons for Cerkl. A knockdown zebrafish model showed abnormal eye development with lamination defects, failure to develop photoreceptor outer segments, increased apoptosis of retinal cells and small eyes (Riera et al 2013). These data support the role of

zebrafish Cerkl in survival and protection of the retinal tissue rather than in proliferation and neural differentiation.

## Biosynthesis defects with skin involvement

### CERS3 mutations

Ceramides are particularly abundant in the stratum corneum of the skin. These epidermal lipids exhibit peculiar structures and play a key role in maintaining skin barrier homeostasis, protection about dessication and against microbial infection. Two independent studies have recently identified CERS3 mutations as a cause of autosomal recessive congenital ichthyosis (ARCI; OMIM#615276). The CERS3 gene is mainly expressed in the skin and testis (Mizutani et al 2006). Eckl and collaborators identified a German consanguineous family with ARCI associated with the p.W15R substitution in CerS3 (Eckl et al 2013). One of the affected girls presented at birth an extreme ectropion at eclabium with collodion membrane. Then, she exhibited a moderate lamellar ichthyosis, scaling of the scalp and a pronounced keratotic lichenification with prematurely aged appearance. Light microscopy revealed mild acanthosis and a moderate and compact orthohyperkeratosis with hyperplastic papillomatous epidermis.

Radner and coworkers characterized a splice site mutation of CERS3 that causes exon 9 skipping (Radner et al 2013). The 30-year-old Tunisian patient presented as collodion baby at birth, with erythema, scaling, moderate hyperkeratosis, and a premature aging aspect of hands. Analysis of the skin showed acanthosis with thickening of the stratum granulosum, psoriasiform epidermal hyperplasia and a delayed terminal differentiation of keratinocytes. Four additional Tunisian patients were affected with a contiguous gene deletion (100 kb) syndrome involving exon 13 of CERS3 and ADAMTS17. These patients presented a combination of the above ichthyosiform phenotype and the symptoms of Weill-Marchesini-like syndome due to ADAMTS17 mutations.

CerS3 is an ER integral protein that exhibits two motifs, a homeobox domain and a TLC domain (residues 130–331) containing the active site (Kageyama-Yahara and Riezman 2006). The p.W15R mutation affects a rather conserved motif of ~30 residues in the N-terminal domain of CerS3, that leads to impaired enzyme activity. The amount of the mutant CERS3 transcript was midly decreased in patient keratinocytes. The synthesis of CerS3, which normally localizes at the interface between stratum granulosum and stratum corneum, was slightly reduced in the patient's skin. Expression of involucrin, loricrin, filaggrin, and epidermal lipoxygenases was upregulated, while that of structural proteins of basal and suprabasal keratinocytes was unchanged. CerS3 is believed to specifically synthesize ceramides with ultra long (C≧26) acyl chain length. Lysates of keratinocytes from the patient reported by Eckl et al failed to produce C26-ceramide (Eckl et al 2013). Mass spectrometry analysis of ceramides in terminally differentiating keratinocytes from the p.W15R patient revealed a lack of non-hydroxylated and ω-hydroxylated ceramides with C26:0 and longer fatty acyl chains.

The loss of CerS3 function and subsequent lack of these ceramides likely result in disturbed epidermal differentiation and premature keratinization. Consistent with the above findings, the splice mutation identified by Radner and colleagues affected the TLC domain and led to undetectable CerS3 protein and a marked reduction of very long chain ceramides (Radner et al 2013). Hence, these observations indicate the important role of CerS3 and ultra long chain ceramides in human skin barrier function.

Mice with a disrupted (exon 7 deleted) Cers3 gene exhibited skin defects consistent with the corresponding human condition but showed a more severe phenotype than human patients (Jennemann et al 2012). These mutant mice die within the first hours after birth. They show unwrinkled and erythematous skin, and defective skin barrier function against water loss and pathogen invasion. The epidermal lipid composition of these animals is drastically impaired, with a loss of ceramides with C≧26 ceramides, likely responsible for the non-functional cornified lipid envelope.

The ichthyotic patients with CERS3 mutations received classical treatments, including baths and supportive emollients. Based on the above defects, one could speculate that topical application of specific ceramides (i.e., containing very long acyl chains) may ameliorate the phenotype.

### *ST3GAL5 mutations*

A majority of patients with the Amish epilepsy syndrome linked to GM3 synthase deficiency exhibit hyperpigmented macules on the dorsal part of hands and feet, but also in other locations (Wang et al 2013). The frequency of the macules seems to correlate with age. Some patients also show patches of skin depigmentation. These cutaneous changes are not associated with the severity or particular phenotype of the neurologic disease.

## Other phenotypes

The histo-blood group antigens P1PK are glycosphingolipids present on red blood cells and other tissues. A4GALT encodes the Gb3 synthase involved in the synthesis of the $P^K$ (or Gb3/CD77) and P1 antigens (Keusch et al 2000; Kojima et al 2000; Thuresson et al 2011). Of note, synthesis of the P1 antigen is

linked to a polymorphism occurring in exon 2a of A4GALT (Thuresson et al 2011). $P^K$ is then converted by the Gb4 synthase, encoded by the B3GALNT1 gene, into P antigen (or Gb4) (Hellberg et al 2002). While A4GALT mutations lead to the rare "p phenotype", in which the $P^K$, P, and P1 antigens are missing (Furukawa et al 2000; Steffensen et al 2000), mutations in B3GALNT1 induce the $P^K$ phenotype lacking P antigen (Hellberg et al 2002). Naturally occurring antibodies directed against the missing antigens cause hemolytic transfusion reactions. Furthermore, a high incidence of miscarriage has been reported among women with those phenotypes. Elsewhere, as those antigens act as receptors for pathogens such as HIV, parvovirus or E. coli, the p and $P^K$ phenotypes can confer resistance to infections (Lingwood et al 1987; Brown et al 1993; Lund et al 2009).

The peculiar p.Q211E mutation that occurs in Gb3 synthase alters the substrate specificity and gives rise to the synthesis of the NOR antigens (Suchanowska et al 2012). NOR-positive individuals apparently do not show any morbid symptoms, but their erythrocytes are agglutinated by most human sera, creating a risk of complications during transfusion of NOR erythrocytes. So far, the rare NOR polyagglutination syndrome has only been described in two families (Harris et al 1982; Kusnierz-Alejska et al 1999).

An A4galt-deficient mouse was engineered which does not produce any glycolipids of the globo-series (synthesized from Gb3) (Okuda et al 2006). These mice were resistant to verotoxin injection and allowed to identify Gb3 and its derivatives as the unique receptors for this toxin in vivo.

## Concluding remarks

The importance of SLs in health and disease is acutely demonstrated by the devastating consequences of their disturbed catabolism in lysosomal storage diseases. Newly identified human genetic defects in the SL biosynthesis pathway further highlight the critical role of this lipid family. It can reasonably be anticipated that additional novel inherited deficiencies of SL synthesis will be discovered. These recently delineated conditions often resemble the phenotypes described so far in genetically-engineered mice. Such animal models and the cell lines derived from the human patients bearing these gene defects represent unique tools to investigate SL metabolism and functions. Nevertheless, the molecular bases underlying the pathophysiology of these disorders are still enigmatic. Except for HSAN1 where the abnormal sphingoid bases seem to be the culprit, the biochemical causes of SL synthesis defects remain to be elucidated. Whether tissue dysfunction and symptoms are due to insufficient production of one or more SL (or perhaps some SL molecular species), accumulation of a precursor or a toxic metabolite requires investigation. Deciphering these pathophysiological bases will undoubtedly guide us toward therapeutic options for this new class of metabolic disorders.

**Acknowledgments** This work was supported by INSERM, Université Paul Sabatier, ANR (SphingoDR program), RITC, LNCC (Equipe Labellisée 2013), CHU Toulouse, and the Vaincre les Maladies Lysosomales Foundation (for TL's group), and the Gebert Rüf Foundation, the Center for Integrative Human Physiology (ZIHP, University of Zurich), "radiz" – Rare Disease Initiative Zurich, Clinical Research Priority Program for Rare Diseases, University of Zurich, and the European Commission (LSHM-CT-2006-037631) (for TH's group).

**Compliance with Ethics Guidelines**

**Conflict of Interest** None.

**Human and Animal Rights and Informed Consent** This article does not contain any studies with human or animal subjects performed by any of the authors.

## References

Aleman TS, Soumittra N, Cideciyan AV et al (2009) CERKL mutations cause an autosomal recessive cone-rod dystrophy with inner retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 50(12):5944–5954

Ali M, Ramprasad VL, Soumittra N et al (2008) A missense mutation in the nuclear localization signal sequence of CERKL (p. R106S) causes autosomal recessive retinal degeneration. Mol Vis 14: 1960–1964

Auer-Grumbach M, Bode H, Pieber TR et al (2013) Mutations at Ser331 in the HSN type I gene SPTLC1 are associated with a distinct syndromic phenotype. Eur J Med Genet 56(5):266–269

Auslender N, Sharon D, Abbasi AH, Garzozi HJ, Banin E, Ben-Yosef T (2007) A common founder mutation of CERKL underlies autosomal recessive retinal degeneration with early macular involvement among Yemenite Jews. Invest Ophthalmol Vis Sci 48(12):5431–5438

Avila-Fernandez A, Riveiro-Alvarez R, Vallespin E et al (2008) CERKL mutations and associated phenotypes in seven Spanish families with autosomal recessive retinitis pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci 49(6):2709–2713

Bayes M, Goldaracena B, Martinez-Mir A et al (1998) A new autosomal recessive retinitis pigmentosa locus maps on chromosome 2q31-q33. J Med Genet 35(2):141–145

Bejaoui K, Uchida Y, Yasuda S et al (2002) Hereditary sensory neuropathy type 1 mutations confer dominant negative effects on serine palmitoyltransferase, critical for sphingolipid synthesis. J Clin Invest 110(9):1301–1308

Bejaoui K, Wu C, Scheffler MD et al (2001) SPTLC1 is mutated in hereditary sensory neuropathy, type 1. Nat Genet 27(3):261–262

Ben-David O, Pewzner-Jung Y, Brenner O et al (2011) Encephalopathy caused by ablation of very long acyl chain ceramide synthesis may be largely due to reduced galactosylceramide levels. J Biol Chem 286(34):30022–30033

Boccuto L, Aoki K, Flanagan-Steet H et al (2013) A mutation in a ganglioside biosynthetic enzyme, ST3GAL5, results in salt & pepper syndrome, a neurocutaneous disorder with altered glycolipid and glycoprotein glycosylation. Hum Mol Genet 23(2):418–433

Boukhris A, Schule R, Loureiro JL et al (2013) Alteration of ganglioside biosynthesis responsible for complex hereditary spastic paraplegia. Am J Hum Genet 93(1):118–123

Brown KE, Anderson SM, Young NS (1993) Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. Science 262(5130):114–117

Cao L, Huang XJ, Chen CJ, Chen SD (2013) A rare family with Hereditary Spastic Paraplegia Type 35 due to novel FA2H mutations: a case report with literature review. J Neurol Sci 329(1–2):1–5

Chiavegatto S, Sun J, Nelson RJ, Schnaar RL (2000) A functional role for complex gangliosides: motor deficits in GM2/GD2 synthase knockout mice. Exp Neurol 166(2):227–234

Citterio A, Arnoldi A, Panzeri E et al (2014) Mutations in CYP2U1, DDHD2 and GBA2 genes are rare causes of complicated forms of hereditary spastic paraparesis. J Neurol 261(2):373–381

Cox TM, Cachon-Gonzalez MB (2012) The cellular pathology of lysosomal diseases. J Pathol 226(2):241–254

Cuadros R, Montejo de Garcini E, Wandosell F, Faircloth G, Fernandez-Sousa JM, Avila J (2000) The marine compound spisulosine, an inhibitor of cell proliferation, promotes the disassembly of actin stress fibers. Cancer Lett 152(1):23–29

Davidson G, Murphy S, Polke J et al (2012) Frequency of mutations in the genes associated with hereditary sensory and autonomic neuropathy in a UK cohort. J Neurol 259(8):1673–1685

Dawkins JL, Hulme DJ, Brahmbhatt SB, Auer-Grumbach M, Nicholson GA (2001) Mutations in SPTLC1, encoding serine palmitoyltransferase, long chain base subunit-1, cause hereditary sensory neuropathy type I. Nat Genet 27(3):309–312

Dick KJ, Eckhardt M, Paisan-Ruiz C et al (2010) Mutation of FA2H underlies a complicated form of hereditary spastic paraplegia (SPG35). Hum Mutat 31(4):E1251–1260

Donkervoort S, Dastgir J, Hu Y et al (2014) Phenotypic variability of a likely FA2H founder mutation in a family with complicated hereditary spastic paraplegia. Clin Genet 85(4):393–395

Dyck PJ (1993) Neuronal atrophy and degeneration predominantly affecting peripheral sensory and autonomic neurons. In P J Dyck, K P Thomas, J W Griffin, P A Low, & J F Poduslo (Eds), Peripheral Neuropathy (3rd Editio, pp 1065–1093) Saunders Philladelphia

Eckl KM, Tidhar R, Thiele H et al (2013) Impaired epidermal ceramide synthesis causes autosomal recessive congenital ichthyosis and reveals the importance of ceramide acyl chain length. J Invest Dermatol 133(9):2202–2211

Edvardson S, Hama H, Shaag A et al (2008) Mutations in the fatty acid 2-hydroxylase gene are associated with leukodystrophy with spastic paraparesis and dystonia. Am J Hum Genet 83(5):643–648

Farukhi F, Dakkouri C, Wang H, Wiztnitzer M, Traboulsi EI (2006) Etiology of vision loss in ganglioside GM3 synthase deficiency. Ophthalmic Genet 27(3):89–91

Fishman PH, Max SR, Tallman JF, Brady RO, Maclaren NK, Cornblath M (1975) Deficient Ganglioside Biosynthesis: a novel human sphingolipidosis. Science 187(4171):68–70

Fragaki K, Ait-El-Mkadem S, Chaussenot A et al (2013) Refractory epilepsy and mitochondrial dysfunction due to GM3 synthase deficiency. Eur J Hum Genet 21(5):528–534

Furukawa K, Iwamura K, Uchikawa M et al (2000) Molecular basis for the p phenotype. Identification of distinct and multiple mutations in the alpha 1,4-galactosyltransferase gene in Swedish and Japanese individuals. J Biol Chem 275(48):37752–37756

Futerman AH, van Meer G (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. Nat Rev Mol Cell Biol 5(7):554–565

Garanto A, Mandal NA, Egido-Gabas M et al (2013) Specific sphingolipid content decrease in Cerkl knockdown mouse retinas. Exp Eye Res 110:96–106

Garanto A, Vicente-Tejedor J, Riera M et al (2012) Targeted knockdown of Cerkl, a retinal dystrophy gene, causes mild affectation of the retinal ganglion cell layer. Biochim Biophys Acta 1822(8):1258–1269

Garofalo K, Penno A, Schmidt BP et al (2011) Oral L-serine supplementation reduces production of neurotoxic deoxysphingolipids in mice and humans with hereditary sensory autonomic neuropathy type 1. J Clin Invest 121(12):4735–4745

Garone C, Pippucci T, Cordelli DM et al (2011) FA2H-related disorders: a novel c.270+3A>T splice-site mutation leads to a complex neurodegenerative phenotype. Dev Med Child Neurol 53(10):958–961

Graf C, Niwa S, Muller M, Kinzel B, Bornancin F (2008) Wild-type levels of ceramide and ceramide-1-phosphate in the retina of ceramide kinase-like-deficient mice. Biochem Biophys Res Commun 373(1):159–163

Hama H (2010) Fatty acid 2-Hydroxylation in mammalian sphingolipid biology. Biochim Biophys Acta 1801(4):405–414

Hammer MB, Eleuch-Fayache G, Schottlaender LV et al (2013) Mutations in GBA2 cause autosomal-recessive cerebellar ataxia with spasticity. Am J Hum Genet 92(2):245–251

Hanada K (2003) Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. Biochim Biophys Acta 1632(1–3):16–30

Harlalka GV, Lehman A, Chioza B et al (2013) Mutations in B4GALNT1 (GM2 synthase) underlie a new disorder of ganglioside biosynthesis. Brain 136(Pt 12):3618–3624

Harris PA, Roman GK, Moulds JJ, Bird GW, Shah NG (1982) An inherited RBC characteristic, NOR, resulting in erythrocyte polyagglutination. Vox Sang 42(3):134–140

Hellberg A, Poole J, Olsson ML (2002) Molecular basis of the globoside-deficient P (k) blood group phenotype. Identification of four inactivating mutations in the UDP-N-acetylgalactosamine: globotriaosylceramide 3-beta-N-acetylgalactosaminyltransferase gene. J Biol Chem 277(33):29455–29459

Hellberg A, Ringressi A, Yahalom V, Safwenberg J, Reid ME, Olsson ML (2004) Genetic heterogeneity at the glycosyltransferase loci underlying the GLOB blood group system and collection. Br J Haematol 125(4):528–536

Hellberg A, Schmidt-Melbye AC, Reid ME, Olsson ML (2008) Expression of a novel missense mutation found in the A4GALT gene of Amish individuals with the p phenotype. Transfusion 48(3):479–487

Hellberg A, Steffensen R, Yahalom V et al (2003) Additional molecular bases of the clinically important p blood group phenotype. Transfusion 43(7):899–907

Huehne K, Zweier C, Raab K et al (2008) Novel missense, insertion and deletion mutations in the neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1 gene (NTRK1) associated with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. Neuromuscul Disord 18(2):159–166

Imgrund S, Hartmann D, Farwanah H et al (2009) Adult ceramide synthase 2 (CERS2)-deficient mice exhibit myelin sheath defects, cerebellar degeneration, and hepatocarcinomas. J Biol Chem 284(48):33549–33560

Jennemann R, Rabionet M, Gorgas K et al (2012) Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption. Hum Mol Genet 21(3):586–608

Kageyama-Yahara N, Riezman H (2006) Transmembrane topology of ceramide synthase in yeast. Biochem J 398(3):585–593

Keusch JJ, Manzella SM, Nyame KA, Cummings RD, Baenziger JU (2000) Cloning of Gb3 synthase, the key enzyme in globo-series glycosphingolipid synthesis, predicts a family of alpha 1, 4-glycosyltransferases conserved in plants, insects, and mammals. J Biol Chem 275(33):25315–25321

Koda Y, Soejima M, Sato H, Maeda Y, Kimura H (2002) Three-base deletion and one-base insertion of the alpha (1,4) galactosyltransferase gene responsible for the P phenotype. Transfusion 42(1):48–51

Kojima Y, Fukumoto S, Furukawa K et al (2000) Molecular cloning of globotriaosylceramide/CD77 synthase, a glycosyltransferase that initiates the synthesis of globo series glycosphingolipids. J Biol Chem 275(20):15152–15156

Kruer MC, Paisan-Ruiz C, Boddaert N et al (2010) Defective FA2H leads to a novel form of neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA). Ann Neurol 68(5):611–618

Kusnierz-Alejska G, Duk M, Storry JR et al (1999) NOR polyagglutination and Sta glycophorin in one family: relation of

NOR polyagglutination to terminal alpha-galactose residues and abnormal glycolipids. Transfusion 39(1):32–38
Laurá M, Eichler F, Hornemann T, et al (2012) Hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1: correlation of severity and plasma atypical deoxy-sphyngoid bases. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2012 83 (e1)
Levy M, Futerman AH (2010) Mammalian ceramide synthases. IUBMB Life 62(5):347–356
Liao X, Luo Y, Zhan Z, et al (2013) SPG35 contributes to the second common subtype of AR-HSP in China: frequency analysis and functional characterization of FA2H gene mutations. Clin Genet
Lingwood CA, Law H, Richardson S et al (1987) Glycolipid binding of purified and recombinant Escherichia coli produced verotoxin in vitro. J Biol Chem 262(18):8834–8839
Littink KW, Koenekoop RK, van den Born LI et al (2010) Homozygosity mapping in patients with cone-rod dystrophy: novel mutations and clinical characterizations. Invest Ophthalmol Vis Sci 51(11):5943–5951
Liu Y, Su Y, Wiznitzer M, Epifano O, Ladisch S (2008) Ganglioside depletion and EGF responses of human GM3 synthase-deficient fibroblasts. Glycobiology 18(8):593–601
Liu YC, Zheng L, Liu Y et al (2013) Pedigree investigation and genetic analysis of a case with p blood group. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi 30(6):736–738
Lund N, Olsson ML, Ramkumar S et al (2009) The human P (k) histo-blood group antigen provides protection against HIV-1 infection. Blood 113(20):4980–4991
Martin E, Schule R, Smets K et al (2013) Loss of function of glucocerebrosidase GBA2 is responsible for motor neuron defects in hereditary spastic paraplegia. Am J Hum Genet 92(2):238–244
Mizutani Y, Kihara A, Igarashi Y (2006) LASS3 (longevity assurance homologue 3) is a mainly testis-specific (dihydro) ceramide synthase with relatively broad substrate specificity. Biochem J 398(3): 531–538
Mosbech M, Olsen A, Neess D, et al (2014) Reduced ceramide synthase 2 activity causes progressive myoclonic epilepsy. Ann Clin Transl Neurol in press
Mullen TD, Hannun YA, Obeid LM (2012) Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. Biochem J 441(3): 789–802
Murphy SM, Ernst D, Wei Y et al (2013) Hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1 (HSANI) caused by a novel mutation in SPTLC2. Neurology 80(23):2106–2111
Niimi K, Nishioka C, Miyamoto T et al (2011) Impairment of neuropsychological behaviors in ganglioside GM3-knockout mice. Biochem Biophys Res Commun 406(4):524–528
Nishiguchi KM, Tearle RG, Liu YP et al (2013) Whole genome sequencing in patients with retinitis pigmentosa reveals pathogenic DNA structural changes and NEK2 as a new disease gene. Proc Natl Acad Sci U S A 110(40):16139–16144
Okuda T, Tokuda N, Numata S et al (2006) Targeted disruption of Gb3/CD77 synthase gene resulted in the complete deletion of globo-series glycosphingolipids and loss of sensitivity to verotoxins. J Biol Chem 281(15):10230–10235
Penno A, Reilly MM, Houlden H et al (2010) Hereditary sensory neuropathy type 1 is caused by the accumulation of two neurotoxic sphingolipids. J Biol Chem 285(15):11178–11187
Pewzner-Jung Y, Ben-Dor S, Futerman AH (2006) When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)? Insights into the regulation of ceramide synthesis. J Biol Chem 281(35):25001–25005
Pewzner-Jung Y, Brenner O, Braun S et al (2010a) A critical role for ceramide synthase 2 in liver homeostasis: II. insights into molecular changes leading to hepatopathy. J Biol Chem 285(14):10911–10923
Pewzner-Jung Y, Park H, Laviad EL et al (2010b) A critical role for ceramide synthase 2 in liver homeostasis: I. alterations in lipid metabolic pathways. J Biol Chem 285(14):10902–10910
Pierson TM, Simeonov DR, Sincan M et al (2012) Exome sequencing and SNP analysis detect novel compound heterozygosity in fatty acid hydroxylase-associated neurodegeneration. Eur J Hum Genet 20(4):476–479
Potter KA, Kern MJ, Fullbright G et al (2011) Central nervous system dysfunction in a mouse model of FA2H deficiency. Glia 59(7): 1009–1021
Radner FP, Marrakchi S, Kirchmeier P et al (2013) Mutations in CERS3 cause autosomal recessive congenital ichthyosis in humans. PLoS Genet 9(6):e1003536
Rautenstrauss B, Neitzel B, Muench C, Haas J, Holinski-Feder E (2009) Late onset hereditary sensory neuropathy type 1 (HSN1) caused by a novel p. C133R missense mutation in SPTLC1. Würzburg, Germany. In: 2009 Meeting of the Peripheral Nerve Society July 4–8, 2009 (p 290 of 381)
Riera M, Burguera D, Garcia-Fernandez J, Gonzalez-Duarte R (2013) CERKL knockdown causes retinal degeneration in zebrafish. PLoS One 8(5):e64048
Rotthier A, Auer-Grumbach M, Janssens K et al (2010) Mutations in the SPTLC2 subunit of serine palmitoyltransferase cause hereditary sensory and autonomic neuropathy type I. Am J Hum Genet 87(4):513–522
Rotthier A, Baets J, De Vriendt E et al (2009) Genes for hereditary sensory and autonomic neuropathies: a genotype-phenotype correlation. Brain 132(Pt 10):2699–2711
Rotthier A, Baets J, Timmerman V, Janssens K (2012) Mechanisms of disease in hereditary sensory and autonomic neuropathies. Nat Rev Neurol 8(2):73–85
Rotthier A, Penno A, Rautenstrauss B et al (2011) Characterization of two mutations in the SPTLC1 subunit of serine palmitoyltransferase associated with hereditary sensory and autonomic neuropathy type I. Hum Mutat 32(6):E2211–2225
Rupps R, Hukin J, Balicki M, Mercimek-Mahmutoglu S, Rolfs A, Dias C (2013) Novel Mutations in FA2H-Associated Neurodegeneration: An Underrecognized Condition? J Child Neurol 28(11):1500–1504
Sabourdy F, Kedjouar B, Sorli SC et al (2008) Functions of sphingolipid metabolism in mammals–lessons from genetic defects. Biochim Biophys Acta 1781(4):145–183
Sheikh KA, Sun J, Liu Y et al (1999) Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects. Proc Natl Acad Sci U S A 96(13):7532–7537
Simpson MA, Cross H, Proukakis C et al (2004) Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase. Nat Genet 36(11):1225–1229
Steffensen R, Carlier K, Wiels J et al (2000) Cloning and expression of the histo-blood group Pk UDP-galactose: Ga1beta-4G1cbeta1-cer alpha1, 4-galactosyltransferase. Molecular genetic basis of the p phenotype. J Biol Chem 275(22):16723–16729
Suchanowska A, Kaczmarek R, Duk M et al (2012) A single point mutation in the gene encoding Gb3/CD77 synthase causes a rare inherited polyagglutination syndrome. J Biol Chem 287(45):38220–38230
Suh BC, Hong YB, Nakhro K, Nam SH, Chung KW, Choi BO (2013) Early-onset severe hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1 with S331F SPTLC1 mutation. Mol Med Rep 9(2):481–486
Suh BC, Hong YB, Nakhro K, Nam SH, Chung KW, Choi BO (2014) Early-onset severe hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1 with S331F SPTLC1 mutation. Mol Med Rep 9(2):481–486
Takamiya K, Yamamoto A, Furukawa K et al (1996) Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system. Proc Natl Acad Sci U S A 93(20):10662–10667
Tang Z, Wang Z, Wang Z, Ke T, Wang QK, Liu M (2009) Novel compound heterozygous mutations in CERKL cause autosomal recessive retinitis pigmentosa in a nonconsanguineous Chinese family. Arch Ophthalmol 127(8):1077–1078

Teufel A, Maass T, Galle PR, Malik N (2009) The longevity assurance homologue of yeast lag1 (Lass) gene family (review). Int J Mol Med 23(2):135–140

Thuresson B, Westman JS, Olsson ML (2011) Identification of a novel A4GALT exon reveals the genetic basis of the P1/P2 histo-blood groups. Blood 117(2):678–687

Tonelli A, D'Angelo MG, Arrigoni F et al (2012) Atypical adult onset complicated spastic paraparesis with thin corpus callosum in two patients carrying a novel FA2H mutation. Eur J Neurol 19(11):e127–129

Tuson M, Marfany G, Gonzalez-Duarte R (2004) Mutation of CERKL, a novel human ceramide kinase gene, causes autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP26). Am J Hum Genet 74(1):128–138

Verhoeven K, Coen K, De Vriendt E et al (2004) SPTLC1 mutation in twin sisters with hereditary sensory neuropathy type I. Neurology 62(6):1001–1002

Vanni N, Fruscione F, Ferlazzo E et al. (2014) Impairment of ceramide synthesis causes a novel progressive myoclonus epilepsy. Ann Neurol (in press)

Votsi C, Zamba-Papanicolaou E, Middleton LT, Pantzaris M, Christodoulou K (2014) A novel GBA2 gene missense mutation in spastic ataxia. Ann Hum Genet 78(1):13–22

Wakil SM, Monies DM, Ramzan K, et al (2013) Novel B4GALNT1 mutations in a complicated form of hereditary spastic paraplegia. Clin Genet

Wang H, Bright A, Xin B, Bockoven JR, Paller AS (2013) Cutaneous dyspigmentation in patients with ganglioside GM3 synthase deficiency. Am J Med Genet A 161A(4):875–879

Wang YC, Chang CF, Lin HC et al (2011) Functional characterisation of a complex mutation in the alpha (1,4) galactosyltransferase gene in Taiwanese individuals with p phenotype. Transfus Med 21(2):84–89

Wei L, Ji YL, Luo H et al (2012) Serological and genetic study of a pedigree featuring a rare p phenotype. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi 29(6):701–704

Westman JS, Hellberg A, Peyrard T, Hustinx H, Thuresson B, Olsson ML (2013) P1/P2 genotyping of known and novel null alleles in the P1PK and GLOB histo-blood group systems. Transfusion 53(11 Suppl 2):2928–2939

Wilkinson PA, Simpson MA, Bastaki L et al (2005) A new locus for autosomal recessive complicated hereditary spastic paraplegia (SPG26) maps to chromosome 12p11.1-12q14. J Med Genet 42(1):80–82

Xu YH, Barnes S, Sun Y, Grabowski GA (2010) Multi-system disorders of glycosphingolipid and ganglioside metabolism. J Lipid Res 51(7):1643–1675

Yamashita T, Hashiramoto A, Haluzik M et al (2003) Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. Proc Natl Acad Sci U S A 100(6):3445–3449

Yan LX, Zhu FM, Xu XG, Hong XZ (2003) One base deletion of the alpha (1,4) galactosyltransferase gene responsible for p phenotype. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi 20(6): 495–498

Yildiz Y, Matern H, Thompson B et al (2006) Mutation of beta-glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility. J Clin Invest 116(11):2985–2994

Yoshikawa M, Go S, Takasaki K et al (2009) Mice lacking ganglioside GM3 synthase exhibit complete hearing loss due to selective degeneration of the organ of Corti. Proc Natl Acad Sci U S A 106(23): 9483–9488

Zitomer NC, Mitchell T, Voss KA et al (2009) Ceramide synthase inhibition by fumonisin B1 causes accumulation of 1-deoxysphinganine: a novel category of bioactive 1-deoxysphingoid bases and 1-deoxydihydroceramides biosynthesized by mammalian cell lines and animals. J Biol Chem 284(8):4786–4795

Zoller I, Meixner M, Hartmann D et al (2008) Absence of 2-hydroxylated sphingolipids is compatible with normal neural development but causes late-onset axon and myelin sheath degeneration. J Neurosci 28(39):9741–9754

Zuellig RA, Hornemann T, Othman A et al (2014) Deoxysphingolipids, novel biomarkers for type 2 diabetes, are cytotoxic for insulin-producing cells. Diabetes 63(4):1326–1339

A homozygous missense mutation (p.H183Q) in the gene encoding ceramide synthase 1 (CERS1) has just been identified in Algerian siblings affected with myoclonic epilepsy and cognitive decline. This autosomal recessive condition is presumably linked to defective biosynthesis of C18-ceramides (Vanni et al. 2014).

Biochimica et Biophysica Acta 1851 (2015) 1040–1051

Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbalip

Review

# Monogenic neurological disorders of sphingolipid metabolism☆

Frédérique Sabourdy [a,b,c], Leonardo Astudillo [a,b,d], Céline Colacios [a,b], Patricia Dubot [c], Marguerite Mrad [a,b], Bruno Ségui [a,b], Nathalie Andrieu-Abadie [a,b], Thierry Levade [a,b,c,*]

[a] Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR1037, Toulouse, France
[b] Equipe Labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer 2013, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Université de Toulouse-III Paul Sabatier, Toulouse, France
[c] Laboratoire de Biochimie Métabolique, Institut Fédératif de Biologie, CHU Purpan, Toulouse, France
[d] Service de Médecine Interne, CHU Purpan, Toulouse, France

ARTICLE INFO

*Article history:*
Received 13 November 2014
Received in revised form 10 January 2015
Accepted 12 January 2015
Available online 7 February 2015

*Keywords:*
Ceramide
Genetic defects
Sphingolipidoses
Ganglioside
Glycolipid
Central nervous system

ABSTRACT

Sphingolipids comprise a wide variety of molecules containing a sphingoid long-chain base that can be N-acylated. These lipids are particularly abundant in the central nervous system, being membrane components of neurons as well as non-neuronal cells. Direct evidence that these brain lipids play critical functions in brain physiology is illustrated by the dramatic consequences of genetic disturbances of their metabolism. Inherited defects of both synthesis and catabolism of sphingolipids are now identified in humans. These monogenic disorders are due to mutations in the genes encoding for the enzymes that catalyze either the formation or degradation of simple sphingolipids such as ceramides, or complex sphingolipids like glycolipids. They cause varying degrees of central nervous system dysfunction, quite similarly to the neurological disorders induced in mice by gene disruption of the corresponding enzymes. Herein, the enzyme deficiencies and metabolic alterations that underlie these diseases are reviewed. Their possible pathophysiological mechanisms and the functions played by sphingolipids one can deduce from these conditions are discussed. This article is part of a Special Issue entitled Brain Lipids.
© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Sphingolipids as critical brain constituents

Sphingolipids (SLs) represent one major category of lipids [1], being present in all mammalian cells and lipoproteins. This complex and diverse family of lipid molecules share a common backbone formed by a long-chain sphingoid base. N-acylation of this sphingoid base results in the formation of ceramide. Addition of a phosphate (or a phosphate linked to choline or ethanolamine), galactose or glucose headgroup at the C1 position leads to the formation of the major complex SL classes, i.e., phosphosphingolipids, galactosphingolipids, and glucosylceramide (GlcCer)-based glycosphingolipids, respectively. Since the pioneering studies of the 'brain chemist' J.L.W. Thudichum 130 years ago, and as reflected by the name of some of these lipids, SLs are recognized as abundant elements of the nervous system (though present in all cell types). Indeed, among total human brain lipids (which represent approximately half of the dry weight of the brain), sphingomyelin (SM) accounts for about 15% of total phospholipids and galactocerebrosides for about 15% of total lipids, both of these SLs being even more abundant in the white matter [2]. Together with cholesterol, galactolipids and SM represent major lipids of myelin.

The importance of SLs in the nervous system not only stems from their tissue concentrations but also (mainly) from their biological functions. Convincing evidence has accumulated during the last two decades that various SL molecules are bioactive lipids regulating numerous physiological functions, including neural cell apoptosis, differentiation and repair, dendritogenesis and neurotransmitter release (for reviews, see [3–7]). Table 1 gives some examples of the biological effects that SL molecules can mediate on brain cells. The importance of SLs in brain development and homeostasis is illustrated by the alterations that arise from dysfunctional SL metabolism. Neurological and psychiatric disorders have been associated with abnormal metabolism of different SL molecules; such conditions include neurodegenerative, autoimmune, ischemic disorders, aging, and brain tumors (for reviews, see [3,8–10]). However, the most compelling evidence that SLs are critical players for the functions of the nervous system is undoubtedly a series of genetic disorders that directly affect SL metabolism. These disorders are briefly presented below.

## 2. Overview of sphingolipid metabolism

SLs are amphipathic lipids that typically reside within cellular membranes. The simplest one is ceramide (as a molecule resulting from the condensation of a fatty acid and the sphingoid base, it fits with the classical definition of a lipid). Ceramide (Cer) is formed from

*Abbreviations:* Cer, ceramide; CNS, central nervous system; ER, endoplasmic reticulum; GalCer, galactosylceramide; GlcCer, glucosylceramide; MRI, magnetic resonance imaging; SL, sphingolipid; SM, sphingomyelin

☆ This article is part of a Special Issue entitled Brain Lipids.

* Corresponding author at: INSERM UMR1037, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), 2 Avenue Hubert Curien, CS53717, 31037 Toulouse Cedex 1 France. Tel.: +33 5 82 74 16 19.
*E-mail address:* thierry.levade@inserm.fr (T. Levade).

http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.01.010
1388-1981/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Table 1**
Examples of brain functions regulated by sphingolipids.

| Bioactive SL molecule | Cell type or cell line | Biological effects | Ref. |
|---|---|---|---|
| Sphingosine 1-phosphate (S1P) | Rat hippocampal neurons | Apoptosis | [155] |
| | Rat embryo astrocytes | Proliferation and production of GDNF | [156] |
| | Mouse cortical astrocytes | Secretion of NGF | [157] |
| | Human glioblastoma | Proliferation | [158] |
| | Human umbilical vein endothelial cells | Induction of angiogenesis by glioma-derived S1P | [159] |
| | Rat neural progenitor cells | Migration | [160] |
| | Rat hypothalamic POMC neurons | Reduction of food consumption and increase in energy expenditure | [161] |
| | Human glioma stem-like cells | Proliferation and stemness | [162] |
| Sphingosylphosphocholine (lyso-sphingomyelin) | Bovine middle cerebral artery | Vasoconstriction | [163] |
| | Rat hippocampal (CA1 and CA3) neurons | Protection from behavioral aberrations and neuronal degeneration | [164] |
| | Rat embryo cerebral cortical neurons and mouse hippocampal cell line | Increased synaptic contacts, cell proliferation and clustering | [165] |
| | Rat primary cortical astrocytes | Release of glutamate and TNF | [166] |
| Sphingosine | Rat pituitary cells | Inhibition of voltage-activated calcium channels | [167] |
| | Rat embryo hippocampal neurons and astrocytes | Apoptosis | [168] |
| Psychosine (galactosylsphingosine) | Rat hippocampal CA3 neurons | Protection from neuronal degeneration | [169] |
| | Rat glioma | Apoptosis | [170] |
| | Mouse oligodendrocyte progenitor cells | Apoptosis by activation of caspases-8, 9 and 3 | [83] |
| | Mouse cortical neurons | Inhibition of fast axonal transport | [171] |
| | Human oligodendrocyte progenitor-like cells and primary rat oligodendrocyte progenitor cells | Inhibition of differentiation and survival | [84] |
| Glucosylsphingosine | Rat brain microsomes | Ryanodine receptor-independent calcium mobilization | [172] |
| | Human cholinergic neuron-like cells | Toxicity | [173] |
| Ceramide | Mouse neuroblastoma | Inhibition of cell proliferation and stimulation of neurite outgrowth | [174] |
| | Rat glioma | Apoptosis | [175] |
| | Neonatal rat brain | Protection from hypoxic–ischemic injury | [176] |
| | Human glioma | Inhibition of proliferation and induction of autophagic cell death | [177,178] |
| | Rat cerebral venules | Vasoconstriction and leukocyte–endothelial interactions | [179] |
| | Mouse hippocampus | Depression-like behavior | [180] |
| 2'-hydroxy-ceramide | Rat glioma | Apoptosis | [181] |
| Glucosylceramide | Rat brain microsomes | Ryanodine receptor-dependent calcium mobilization | [172] |
| GM1 | Neonatal rat cerebellar and cortical neurons | Protection against glutamate and kainate neurotoxicity | [182] |
| | Rat striatal synaptosomes | Modulation of the high-affinity dopamine uptake | [183] |
| | Rat hippocampal neurons | Regulation of AMPA receptor trafficking | [184] |
| GM2 | Feline, canine and ovine cortical pyramidal neurons | Dendritogenesis | [185] |

Abbreviations: AMPA, α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor; NGF, nerve growth factor; POMC, pro-opiomelanocortin; TNF, tumor necrosis factor.

smaller lipidic molecules and can be converted to structurally more complex lipids; its degradation leads to the release of simpler molecules. Cer can thus be viewed as a central metabolite in SL metabolism (Fig. 1).

In mammalian cells, Cer biosynthesis starts with the condensation of a long-chain fatty acyl-CoA, usually palmitoyl-CoA, with L-serine, followed by a reduction to produce the saturated sphingoid base sphinganine. Addition by ceramide synthases of an acyl-CoA to sphinganine through an amide bond leads to dihydroceramide, which can be desaturated to form Cer. Whereas all these enzymatic steps occur at the cytosolic surface of the endoplasmic reticulum (ER), further metabolism of Cer takes place in other subcellular compartments except its conversion to β-galactosylceramide (GalCer) and ceramide-phosphoethanolamine, which operates on the luminal side of the ER. Of note, the fatty acyl-CoA used for GalCer synthesis is often 2-hydroxylated as a result of the action of the *FA2H* gene product.

After transport to the Golgi apparatus, Cer can be phosphorylated (to generate ceramide 1-phosphate, a pro-inflammatory mediator), or converted to ceramide-phosphocholine (sphingomyelin, SM) or β-glucosylceramide (GlcCer). At the luminal surfaces of the Golgi and trans-Golgi network, GlcCer gets transformed to numerous glycosphingolipids by stepwise addition of monosaccharides and sialic acid residues (Fig. 1; see [11,12]). The presence of a given glycolipid profile at the cell surface depends on brain cell type and region, changes during ontogenesis and under pathological conditions. The four major gangliosides found in adult brain include GM1, GD1a, GD1b and GT1b (see [13,14]).

Degradation of complex SLs occurs in distinct subcellular compartments. While breakdown of cell surface SM and glycolipids at the level of the plasma membrane may be activated upon certain signals, catabolism in the endosomal/lysosomal system appears to be constitutive and represents the major pathway. The latter allows recycling of plasma membrane constituents after endocytosis (and other membranes by autophagy) through sequential removal of the hydrophilic headgroup components of SLs [note that some glycosphingolipids that are internalized can directly recycle to the plasma membrane or be transported via endosomal vesicles to the Golgi for additional glycosylation [15]]. The lysosomal catabolic pathway is catalyzed by specific hydrolases, likely acting on small intra-endolysosomal vesicles [16]. Degradation of some SLs requires the intervention of so-called activators, i.e., saposins and the GM2 activator. The final step of lysosomal digestion of all SLs is the cleavage of Cer by acid ceramidase, which releases a fatty acid and sphingosine. This sphingosine, as well as that arising from the breakdown of ceramide in other compartments, can either be "recycled" by N-acylation (via ceramide synthases) or phosphorylated. The resulting sphingosine 1-phosphate (S1P) is a potent lipid mediator, which can be dephosphorylated or irreversibly degraded into products that are reused for glycerophospholipid metabolism.

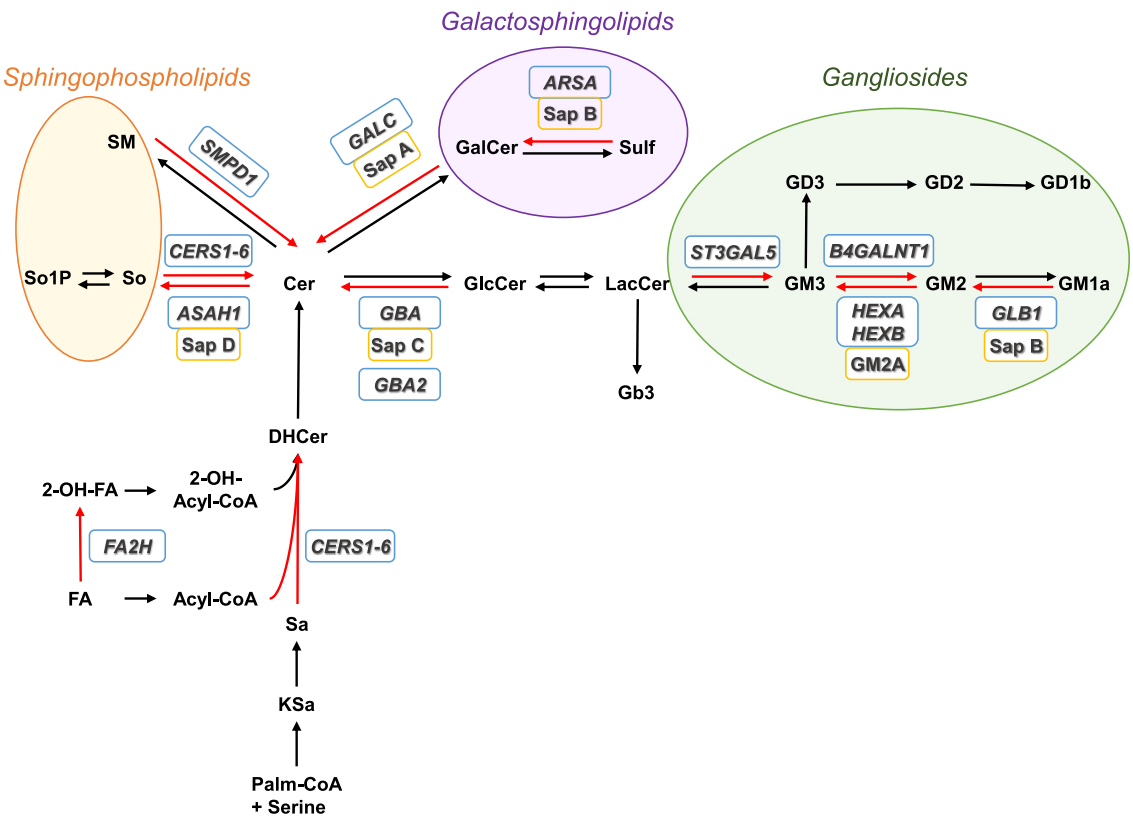


**Fig. 1.** Simplified pathways of sphingolipid metabolism. The pathways that operate in human brain are depicted. Only the genes of the enzymes (and activators) that are mutated in *human brain disorders* are indicated [this is why, for instance, genetic defects of the first, rate-limiting step of SL biosynthesis are not underlined here as they cause a peripheral neuropathy; similarly, the gene encoding α-galactosidase A that cleaves Gb3 is not highlighted here as the corresponding disease can manifest as a cerebrovascular disease and small-fiber peripheral neuropathy]. Defective pathways are denoted as red arrows. The *de novo* pathway for the production of ceramide starts by the condensation of serine and palmitoyl-CoA. Then, dihydroceramide is formed by addition of an acyl-CoA (or a 2-hydroxyacyl-CoA) to sphinganine. Desaturation of dihydroceramide produces ceramide. Ceramide can then be converted to i) the main sphingophospholipid sphingomyelin, ii) galactose-containing sphingolipids, or iii) glycosphingolipids, including gangliosides. Ceramide can also be degraded by ceramidases, releasing sphingosine and fatty acid. Abbreviations: Cer, ceramide; DHCer, dihydroceramide; FA, fatty acid; GalCer, β-galactosylceramide; Gb3, globotriaosylceramide (α-D-galactosyl-(1 → 4)-β-D-galactosyl-(1 → 4)-β-D-glucosyl-(1 → 1′)-ceramide); GD1b, β-D-galactosyl-(1 → 3)-N-acetyl-β-D-galactosaminyl-(1 → 4)-[α-N-acetylneuraminyl-(2 → 8)-α-N-acetylneuraminyl-(2 → 3)]-β-D-galactosyl-(1 → 4)-β-D-glucosyl-(1 → 1′)-ceramide; GD2, N-acetyl-β-D-galactosaminyl-(1 → 4)-[α-N-acetylneuraminyl-(2 → 8)-α-N-acetylneuraminyl-(2 → 3)]-β-D-galactosyl-(1 → 4)-β-D-glucosyl-(1 → 1′)-ceramide; GD3, α-N-acetylneuraminyl-(2 → 8)-α-N-acetylneuraminyl-(2 → 3)-β-D-galactosyl-(1 → 4)-β-D-glucosyl-(1 → 1′)-ceramide; GlcCer, β-glucosylceramide; GM1a, β-D-galactosyl-(1 → 3)-N-acetyl-β-D-galactosaminyl-(1 → 4)-[α-N-acetylneuraminyl-(2 → 3)]-β-D-galactosyl-(1 → 4)-β-D-glucosyl-(1 → 1′)-ceramide; GM2, N-acetyl-β-D-galactosaminyl-(1 → 4)-[α-N-acetylneuraminyl-(2 → 3)]-β-D-galactosyl-(1 → 4)-β-D-glucosyl-(1 → 1′)-ceramide; GM3, N-acetyl-α-neuraminyl-(2 → 3)-β-D-galactosyl-(1 → 4)-β-D-glucosyl-(1 → 1′)-ceramide; KSa, ketosphinganine; LacCer, lactosylceramide (β-D-galactosyl-(1 → 4)-β-D-glucosyl-(1 → 1′)-ceramide); Palm-CoA, palmitoyl-CoA; Sa, sphinganine; Ser, serine; SM, sphingomyelin; So, sphingosine; So1P, sphingosine-1-phosphate; Sulf, sulfatide (3-O-sulfo-β-D-galactosyl-(1 → 1′)-ceramide).

A number of human inherited defects of SL metabolism are known, some of which have been identified very recently. We will describe here only those that affect the central nervous system (CNS), and especially the brain [so that disorders that involve the peripheral nervous system (e.g., hereditary sensory autonomic neuropathy 1) or the retina will not be described]. The major neurological features of these diseases are presented in Table 2. In an attempt to get insights into the (patho)physiological functions of SLs in the brain, the genetic defects are presented below according to the main SL whose level or metabolic pathway is perturbed by the inborn error.

## 3. Defects of ceramide metabolism

As stated above, Cer can be viewed at the crossroads of all SL metabolic routes. Here, we will consider defects of its biosynthesis and its catabolism.

### 3.1. Defects in ceramide synthases

The backbone of SLs, Cer, exhibits an amazing structural diversity. Not only the sphingoid base structure can vary (e.g., C18 or C20) but also the fatty acid moiety can be diverse: brain SLs contain fatty acids ranging from C14 to C26: they are saturated or unsaturated, non-hydroxylated or 2-hydroxylated. Six distinct human ceramide synthases, encoded by the *CERS* genes, have been identified. These enzymes exhibit both tissue-specificity and specificity for the acyl-CoA substrate [17–20]. Two human neurological disorders have been associated with *CERS* mutations.

A homozygous substitution (p.H183Q) in Cer synthase 1 (*CERS1*) has just been identified in an Algerian family [21]. The affected members presented with myoclonic epilepsy and cognitive decline up to dementia. This autosomal recessive condition is likely due to the inability of the mutant enzyme to use C18:0 and C18:1-CoAs, i.e., the preferred substrates of this ceramide synthase isoform expressed in the brain, to synthesize C18:0 and C18:1-(dihydro)ceramides. A pathophysiological mechanism proposed by the authors of this report is the activation of an ER stress response by reduced CERS1 expression, which may subsequently underlie neurodegeneration. Quite in line with the observations in the human patients, disruption of *Cers1* in mice results in an ataxic phenotype related to Purkinje cell death [22,23]. In these mutant animals, the brain levels of C18:0 and C18:1-ceramides (as well as gangliosides) were reduced while the levels of sphingoid bases and phosphorylated sphingoid bases were increased.

The case of an adult male patient harboring a *CERS2* defect has also recently been reported [24]. His clinical picture was dominated by progressive myoclonic epilepsy. Interestingly, this patient carries a

**Table 2**
Human genetic defects of sphingolipid metabolism in the CNS.

| Disease name | Enzyme/protein | Gene | Brain lipid alterations [a] | Main (neurological) symptoms |
|---|---|---|---|---|
| No specific name | Ceramide synthase 1 | *CERS1* | In Cers1-deficient mice: reduced C18:0 and C18:1-Cer but increased C16:0-Cer; decreased SM and hexosylceramides; increased sphingoid bases and phosphorylated sphingoid bases | Myoclonic epilepsy, progressive cognitive deterioration |
| No specific name | Ceramide synthase 2 | *CERS2* | In patient's skin fibroblasts: reduced C24 to C26-Cer (and SM), moderately increased C16 and C18-Cer | Late-onset, progressive myoclonic epilepsy |
| Farber | Acid ceramidase | *ASAH1* | Increased non-hydroxy and 2-hydroxy-Cer | Painful joints, subcutaneous nodules, hoarseness, hepatomegaly, seizures, mental and motor progressive deterioration<br>Variant form: spinal muscular atrophy with progressive myoclonic epilepsy |
| Niemann–Pick type A | Acid sphingomyelinase | *SMPD1* | Increased SM and SPC | Early onset, hepatosplenomegaly, hypotonia, failure to thrive, loss of motor function and deterioration of intellectual capabilities |
| Spastic paraplegia 35 | Fatty acid 2-hydroxylase | *FA2H* | In Fa2h-deficient mice: decreased 2-hydroxy-galactolipids but elevated non-hydroxy GalCer | Onset after 3 years: progressive extrapyramidal syndrome, spastic paraplegia, gait disturbance, dystonia, late mental deterioration. Possible dysarthria, dysmetria and seizures |
| Krabbe | β-Galactosyl-ceramidase | *GALC* | Increased GalCer in macrophages and microglia; increased psychosine | Typical early onset form: irritability, progressive spasticity, developmental regression, blindness, deafness, myoclonic seizures |
| Metachromatic leukodystrophy | Arylsulfatase A | *ARSA* | Accumulation of sulfatides and lyso-sulfatides in myelin-producing cells and myelin | Infantile form: impaired speech and motor development, hypotonia, spastic quadriplegia, ataxia<br>Juvenile form: poor school performance, behavioral disturbance, loss of independent gait and speech<br>Adult form: gradual impairment of intellectual function, behavioral/psychiatric disturbances |
| (Pro)saposin deficiency | Prosaposin or individual saposins | *PSAP* | Elevation of multiple SLs including GlcCer, GalCer, LacCer, GM1, GM2 and GM3 | Generalized deficiency: severe acute neonatal neurovisceral disease including seizures, hypotonia, hepatosplenomegaly<br>See also Krabbe disease (Sap A domain), Metachromatic leukodystrophy (Sap B domain) or Gaucher disease (Sap C domain) for isolated saposin defects |
| GM1-gangliosidosis | GM1 β-galactosidase | *GLB1* | Increased GM1 and GA1 | Infantile form: developmental arrest and regression, seizures, cherry-red macular spot, nystagmus, hepatosplenomegaly<br>Juvenile form: delayed motor and cognitive development<br>Adult form: generalized dystonia |
| Tay–Sachs (or GM2-gangliosidosis, B variant) | β-hexosaminidase, α subunit | *HEXA* | Increased GM2 | Infantile form: developmental arrest, cherry-red macular spot, startle response to noise, hypotonia, seizures, blindness, spasticity<br>Juvenile form: dysarthria, loss of speech, spastic paraparesis, ataxia, mental deterioration, psychoses<br>Adult form: clumsiness, muscle weakness and atrophy, ataxia, psychosis, cognitive decline |
| GM2-gangliosidosis, AB variant | GM2 activator | *GM2A* | Increased GM2 | See Tay–Sachs disease |
| Sandhoff (or GM2-gangliosidosis, 0 variant) | β-hexosaminidase, β subunit | *HEXB* | Increased GM2 and GA2 | See Tay–Sachs disease. In addition, hepatomegaly and skeletal abnormalities |
| Spastic paraplegia 26 | GM2/GD2 synthase | *B4GALNT1* | In patient's skin fibroblasts: increased GM3 and reduced GM2 | Onset from 2 to 19 years: progressive weakness, spasticity and cognitive impairment; cerebellar ataxia |
| Amish infantile epilepsy or 'salt-and-pepper' syndrome | GM3 synthase | *ST3GAL5* | In plasma and skin patients' fibroblasts: lack of GM3 (and GM2), increased Gb3 and Gb4. In plasma, increased LacCer | Severe irritability, poor feeding, vomiting, and failure to thrive. Later, generalized seizures, developmental stagnation, hypotonia, choreoathetoid movements, deterioration of visual function. Skin dyspigmentation |
| Gaucher types 2 and 3 | Acid β-glucosyl-ceramidase | *GBA* | Increased GlcCer and glucosylsphingosine in cerebrum and cerebellum | Type 2 (infantile form): early-onset and rapidly progressing neurological deterioration with organomegaly<br>Type 3 (juvenile/adult form): progressive encephalopathy with myoclonus, ataxia, dementia and horizontal gaze palsy |
| Spastic paraplegia 46 | Non-lysosomal β-glucosyl-ceramidase | *GBA2* | NA | Childhood onset, ataxia, spasticity, mild mental impairment, hearing loss, axonal neuropathy, male infertility |

Abbreviations: LacCer, lactosylceramide; NA, not available; SPC, sphingosylphosphocholine.
[a] When no data regarding human brain are available, the nature of the biological material is indicated.

heterozygous deletion of *CERS2*, which results, at least in skin fibroblasts, in a partial reduction of very long chain (C24 and C26) ceramides (and SM) but a moderate increase in long chain ceramides. Whereas this may lead to altered membrane microdomains (and possibly perturbed sensitivity to neurotransmitters), the reason why *CERS2* haploinsufficiency leads to a neurological disorder is still unclear. In mice, the homozygous ablation of *Cers2*, which exhibits a rather ubiquitous expression, causes a severe disease involving both the brain and visceral organs [25–28]. The demyelination, astrogliosis, microglial activation, and myoclonic jerks seen in these mutant mice are likely related to the decreased brain levels of C22–C24-ceramides and, especially, non-hydroxy and 2-hydroxy-GalCer. These findings emphasize the importance of Cers2-derived SL species in myelin maintenance (see also *FA2H* defects).

Of interest is the finding that mutations in the *CLN8* gene, which are responsible for a form of neuronal ceroid lipofuscinosis, a neurodegenerative disorder characterized by progressive epilepsy and mental regression, are also associated with reduced Cer and GalCer levels in the brain of patients and mutant mice [29,30]. The *CLN8* gene encodes for an ER protein that shares domain homology with Cer synthases [31], and which may modulate their enzymatic activity.

To sum up, defective biosynthesis of some (dihydro)Cer species affects myelin and eventually causes seizures. Nevertheless, which SL alteration primarily accounts for the observed neurological phenotypes remains to be elucidated.

### 3.2. Defects in ceramidase action

Among the five human genes encoding ceramidases (see [32]), only that encoding acid, lysosomal ceramidase, *ASAH1*, is known to underlie human disease when mutated. At the homozygous or compound heterozygous level, pathogenic *ASAH1* mutations lead to different symptoms, most often described under the name of Farber disease or lipogranulomatosis [33]. The clinical spectrum of this disorder is quite broad, including subcutaneous nodules, joint stiffness and swelling (mimicking juvenile arthritis) and various neurological manifestations, in particular seizures and progressive deterioration. A variant, CNS-restricted form of the disease has recently been recognized, which manifests as a spinal muscular atrophy with progressive myoclonic epilepsy [34,35]. Because of the loss (or marked decrease) of acid ceramidase activity, the undegraded Cer accumulates within cells, tissues and body fluids (except, possibly, in case of progressive myoclonic seizures where Cer accumulation might occur only in neurons). In patients' brain, storage of both non-hydroxy and 2-hydroxy-ceramides has been documented, suggesting that part of the accumulated Cer originates from the myelin galactolipids [33]. Further investigation of a new mouse model for Farber disease should tell us whether the pathological changes that accompany lysosomal Cer storage are uniquely mediated by an abnormal cytokine response [36].

A second gene defect can account for perturbed lysosomal Cer turnover. Some mutations in the prosaposin *PSAP* gene lead to a fatal neonatal disease that features massive neuronal loss and lysosomal storage of multiple SLs, including Cer [37–40]. The accumulation of Cer in this disease is likely due to the loss of function of the saposin D domain that normally serves as an activator of acid ceramidase [41, 42]. Accordingly, specific deficiency of saposin D in mice results in Cer storage and cerebellar Purkinje cell degeneration [43].

Thus, both insufficient and excessive Cer cause brain dysfunction with a quite comparable symptomatology in humans.

## 4. Defects of sphingomyelin metabolism

In agreement with studies in mice indicating that defects in either SM synthase 1 or 2 do not induce gross abnormalities, no human disease of SM biosynthesis has yet been reported. Only a recessive disorder due to mutations in the *SMPD1* gene encoding acid sphingomyelinase is known. The neuronopathic form of this lysosomal disorder is called Niemann–Pick disease type A. This severe form of acid sphingomyelinase deficiency is characterized by a hepatosplenomegaly, and an early and rapid neurologic deterioration leading to death generally before 3 years of age [44]. A progressive hypotonia can be first noticed, followed by psychomotor regression. Three *SMPD1* mutations are particularly frequent in the Ashkenazi Jewish population (p.R498L, p.L304P, and p.F333SfsX52).

Mainly SM, but also cholesterol and sphingosylphosphocholine (i.e., lyso-SM) accumulate in visceral tissues, lymph nodes and the brain of Niemann–Pick type A patients [45,46]. Storage of bis(monoacylglycero)phosphate is also evident in the liver. The two acid sphingomyelinase-deficient mouse models [47,48] display a neurodegenerative phenotype more or less similar to the human disease. The brain and cerebellum are particularly affected; they are atrophic, showing multilamellar cytoplasmic inclusions at the ultrastructural level. Loss of Purkinje cells is obvious. SM accumulation is seen in total brain extracts (along with GM2 and GM3) and in myelin [49,50]. Sphingosine and sphingosylphosphocholine levels are also increased in total brain extracts of deficient mice [51]. At the cellular level, the SL content of neuronal and glial cell membranes is modified. Lysosomal but also non-lysosomal membranes, including synaptic membranes, are enriched in SM and sphingosine [49–51]. This change of lipid membrane composition is thought to alter cell signaling (by affecting plama membranes microdomains), neuronal polarization, calcium homeostasis, synaptic plasticity, myelin production and immune response (for a review, see [52]). Recently, SM accumulation in *Smpd1*−/− neurons was shown to be involved in the reduced number and size of dendritic spines [53] and to be associated with autophagy dysfunction [54]. All these findings provide new insights for the development of novel therapeutic strategies in addition to enzyme replacement or gene therapy.

## 5. Defects of galactosphingolipid metabolism

Galactosylceramide-containing SLs, e.g. GalCer and its 3-O-sulfated derivative, are primarily myelin constituents [2]. Of note, these lipids characteristically contain 2-hydroxylated fatty acids. Not surprising, therefore, is the finding that mutations in the *FA2H* gene impair the formation of these myelin SLs both in humans and mice [55–59].

The hydroxylase encoded by *FA2H*, a gene highly expressed in oligodendrocytes, produces 2-hydroxylated fatty acyl-CoAs, which are then incorporated by Cer synthases into SLs, especially galactolipids [60]. Homozygous *FA2H* mutations result in different clinical phenotypes. Some patients present a progressive extrapyramidal syndrome and excessive iron deposition in the brain, some others with spastic paraplegia (SPG35) complicated by cognitive decline, seizures and radiological features of leukodystrophy. To our knowledge, no brain sample from any of these patients has been analyzed. However, in the Fa2h-deficient homozygous mice the brain was almost devoid of 2-hydroxy-galactolipids, but enriched in non-hydroxy GalCer [56,59]. In these models, myelin remains normal in young animals while demyelination is seen in aged mice. As the human disease does not manifest before the age of 3, this has led to the conclusion that 2-hydroxy-galactolipids are essential for long-term maintenance rather than formation of myelin. 2-Hydroxylation of SLs may help stabilize lateral interactions between SLs and membrane–membrane interactions [56,60].

The impairment of the lysosomal catabolism of galactosphingolipids leads to two severe neurological lysosomal storage diseases characterized by progressive demyelination. Metachromatic leukodystrophy is generally due to mutations in the *ARSA* gene that encodes arylsulfatase A, the enzyme that removes the sulfate group from GalCer [61–63]. GalCer is then hydrolyzed to Cer through the action of β-galactosylceramidase, and mutations in the *GALC* gene that impair this reaction lead to Krabbe disease [64].

Several clinical forms of metachromatic leukodystrophy are classically described, according to the age of onset and severity of the disease. The late infantile form is the most severe form, with symptoms occurring between a few months to 2 years of age. Psychomotor delay is first noticed [65], followed by an inexorable psychomotor regression leading to gait and speech loss and then to death. Hypotonia, ataxia, paresis, blindness and pyramidal syndrome are classically reported. Other forms are characterized by a later onset, attenuated symptoms and a slower course. Of note, a similar disease with late onset can be occasionally due to saposin B deficiency (mutations in the *PSAP* gene), as this saposin activates arylsulfatase A [66–68]. Sulfatides accumulate in some visceral tissues but also in neurons, astrocytes and primarily in oligodendrocytes of the CNS and peripheral nervous system [63,69]. Accumulation of lysosulfatide (i.e., galactosylsphingosine-3-O-sulfate) has also been reported [70,71]. Both the storage of (lyso)sulfatides and the lack of GalCer may account for the alterations in myelin structure and properties. As compared to human patients, *Arsa* knockout mice display a milder phenotype, limited to impaired neuromotor coordination and deafness [72]. Demyelination is absent and the ultrastructure of the myelin sheath is preserved, in agreement with the lesser SL storage observed in these mice. Transgenic *Arsa* knockout mice overexpressing the enzymes of galactosphingolipid biosynthesis were engineered in order to increase sulfatide storage [73,74]. These animal models demonstrated that the accumulation of sulfatides not only in myelin-forming cells, but also in neurons, contributes to the severe neurological symptomatology that can be observed in the human disease. Nevertheless, the molecular mechanisms that lead to demyelination remain unclear [75].

The next step of galactosphingolipid catabolism is catalyzed by the β-galactosylceramidase. This enzyme was canonically known to convert GalCer into Cer in the lysosome, but was shown to be also responsible for the hydrolysis of its "lyso-derivative" galactosylsphingosine (also termed psychosine) and of other galactolipids [76]. Mutations in the *GALC* gene leads to Krabbe disease, also called globoid cell leukodystrophy. The onset of the infantile form often occurs before one year of age, the presenting signs including stiffness, irritability and developmental delay. Then, hypertonic episodes such as opisthotonos and myoclonic seizures appear. A rapid regression follows, leading to blindness, deafness, hypotonia and, finally, a vegetative state. Death occurs around 2 years of age. Late infantile, juvenile and adult forms are less severe and show highly variable and unpredictable clinical presentations and evolution. MRI can reveal demyelination, gliosis, late-stage cerebral atrophy, or cerebral calcifications. The twitcher mouse represents an authentic model of Krabbe disease [77]. In humans and mice, cellular alterations include macrophage (globoid cells) infiltration of the brain parenchyma, loss and dysfunction of oligodendrocytes and axonal damage [78,79]. Unexpectedly, while GalCer does not accumulate in the brain neither of Krabbe patients nor twicher mice, galactosylsphingosine clearly does, especially in the white matter [80,81]. There is now convincing evidence for psychosine toxicity, but the underlying mechanisms are ill-defined. Psychosine can induce oligodendrocyte [82–84] as well as neuronal apoptosis, and axonopathy [79]. It was also shown to act on the actin structure of endothelial cells, inhibiting angiogenesis in the brain [85]. As already postulated for other (lyso)SLs, the accumulating psychosine could affect the membrane microdomain architecture, and inhibit PKC and the associated signaling pathways [86,87]. Psychosine can also elicit oxidative stress [88,89]. Recently, it was shown to accelerate the fibrillization of α-synuclein in neurons [90].

Saposin A is the physiological activator of β-galactosylceramidase. Accordingly, mutations in the *PSAP* domain encoding saposin A result in symptoms that are similar to Krabbe disease [91]. The phenotype of saposin A-deficient mice is quite similar to, but in terms of symptomatology and SL storage, milder than that of the twitcher mouse [92]. However, a doubly deficient mouse, obtained by breeding twitcher and saposin A-deficient mice, presented with more severe neurological symptoms than twitcher mice, and widespread neuronal cell death mainly affecting the hippocampus, but also the cerebral cortex. The brain of these mice showed much greater accumulation of lactosylceramide than the twitcher mice, suggesting that lactosylceramide could contribute to the hippocampal neuronal formation and maintenance [93].

## 6. Defects of ganglioside and glucosylceramide metabolism

Inherited deficiencies of the enzymes that both synthesize and degrade glycosphingolipids are known. Here, only those that primarily affect the CNS will be considered.

### 6.1. Defects in ganglioside biosynthesis

Deficient synthesis of GM3 or GM2/GD2 is now known to result in human neurological disease. Loss-of-function mutations in the *ST3GAL5* gene, encoding for the sialyltransferase that synthesizes the simplest ganglioside GM3 (see Fig. 1), cause a recessive infantile-onset symptomatic epilepsy associated with developmental stagnation [94]. In some patients brain MRI has shown occipital white matter abnormalities and cortical atrophy [95]. Abnormally pigmented skin is also observed in some patients [96]. Other mutations, that make the GM3 synthase unstable, appear to lead to a different clinical picture: the so-called 'salt-and-pepper' syndrome includes facial dysmorphism, severe intellectual disability, seizures, spasticity, choreoathetosis and hyper- and hypo-pigmented skin areas [97]. While no data regarding the brain SL composition in this condition are available, the expected lack of GM3 was found in the patients' plasma or skin fibroblasts [94,97]. This was accompanied by a reciprocal increase in the levels of lactosylceramide and glycolipids of the globo- and neolacto-series. Gene targeting of GM3 synthase in mice also impairs neuropsychological behavior [98,99] or causes hearing loss [100]. Whether the increased apoptosis observed in patient's fibroblasts [95] or neural crest cells of zebrafish embryos after *St3gal5* knockdown [97] reflects what may happen in the CNS is unknown. In addition, whether this cell death is triggered by the lack of GM3 (or more complex downstream gangliosides) or the accumulation of globosides needs to be elucidated.

*B4GALNT1* mutations also cause in humans an autosomal recessive disorder characterized by a spastic paraplegia, SPG26 [101,102]. The main feature is a progressive weakness and spasticity affecting the lower and, in some cases, the upper extremities. Patients may also present with a moderate cognitive impairment, cerebellar signs, sensory neuropathy, and psychiatric symptoms. Brain MRI may reveal cortical or subcortical atrophy. Because the *B4GALNT1* gene codes for β-1,4-N-acetyl-galactosaminyltransferase 1, i.e., GM2/GD2 synthase (see Fig. 1), a reduction in brain levels of these gangliosides is anticipated in case of pathogenic mutations. Indeed, glycolipid analysis of patients' fibroblasts showed a lack of GM2 and an accumulation of GM3 gangliosides [103]. Which of these changes (or additional modifications of the major brain gangliosides) leads to the disease manifestations clearly requires further investigation. To address this question, not only biochemical data on patients but also novel animal models are needed. As a matter of fact, the current murine models that lack GM2/GD2 synthase activity do not exhibit major behavioral abnormalities [104–106], emphasizing possible differences between humans and mice in ganglioside metabolism (see also GM2 catabolism below).

### 6.2. Defects in ganglioside catabolism

#### 6.2.1. Defective catabolism of GM1

GM1 (actually GM1a) is one of the major brain gangliosides in mammals. This ganglioside and its asialo-derivative, namely GA1, are normally degraded in the lysosomes by β-galactosidase, an enzyme also able to ensure the degradation of other glycoconjugates. Mutations in the *GLB1* gene lead to two distinct human diseases. While Morquio disease type B (mucopolysaccharidosis type IV B) is dominated by

bone abnormalities, GM1-gangliosidosis is primarily a neurological disorder. Its non-neurological manifestations likely result from the impaired catabolism of oligosaccharides and glycosaminoglycans. Three forms of GM1-gangliosidosis are described according to the age of onset [107]. The infantile form is characterized by a rapid neurological regression leading to death within a few years. The most usual symptoms include mental retardation and hypotonia but also visceromegaly, macular cherry-red spots, skeletal abnormalities and coarse facial features. The juvenile form is of intermediate severity. Psychomotor regression occurs between 7 months and 3 years of age. Visceral and skeletal involvements are less frequent than in the infantile form. Hypotonia, locomotor disturbances, seizures, muscle weakness, lethargy, and strabismus are common features. The adult form presents with skeletal abnormalities and neurological symptoms, including gait disturbances, speech difficulties, dystonia and, less frequently, seizures. While oligosaccharides accumulate in visceral organs, increased levels of GM1 and GA1 are observed in the gray matter of patients' brain [108,109]. Of note, the β-galactosidase-deficient mice present with the main neuropathological and neurochemical features of the human infantile disease [110]. Microscopic analyses revealed vacuolization of neurons and astrocytes, associated with neuronal cell death, demyelination, astrogliosis and microgliosis. How GM1 storage leads to such cellular damages remains poorly understood. Among other hypotheses, ER stress, mitochondria or autophagy-mediated apoptosis have been implicated [111–114]. An inflammatory response has also been incriminated [115]. The myelin deficit could be secondary to neuron, astrocyte and/or oligodendrocyte dysfunctions [116,117].

#### 6.2.2. Defective catabolism of GM2

GM2 storage diseases, namely GM2-gangliosidoses, can arise from distinct molecular defects. Degradation of the GM2 ganglioside starts by its cleavage by the lysosomal enzyme β-hexosaminidase A, which catalyzes the removal of the β-N-acetylgalactosamine residue of the oligosaccharide moiety of the ganglioside. β-Hexosaminidase A is composed of two subunits, α and β, which are encoded by the *HEXA* and *HEXB* genes, respectively. Mutations carried by either of these genes induce GM2-gangliosidosis. In addition, the presence of a third peptide, namely the GM2 activator protein, is absolutely needed for β-hexosaminidase A to ensure GM2 cleavage. Consequently, defects in the *GM2AP* gene also lead to GM2-gangliosidosis.

Mutations in the *HEXA* gene refer to Tay–Sachs disease. This disease is particularly frequent in the Ashkenazy Jewish and Quebec populations [118]. The infantile form begins with mild motor weakness around 3 to 5 months of age, and startled responses to noise. Then, hypotonia, decreased attentiveness, staring episodes and unusual eye movements can be noticed. The presence of a macula cherry red-spot is extremely frequent. Regression occurs from 10 months of age, with a rapid neurologic deterioration, progressive visual loss, and seizures. Macrocephaly resulting from cerebral gliosis can be seen around 2 years of age. The disease eventually leads to a vegetative state, and death occurs between 3 and 5 years of age [119]. In the juvenile form, gait and speech disturbances are the most common symptoms at the onset of the disease. Incoordination, behavioral troubles, intellectual impairment, muscle weakness, seizures and extrapyramidal signs are also commonly observed. Disease often leads to death around the age of 15 [120]. The adult form is linked to a residual enzymatic activity and the diagnosis is often delayed. Patients can present with spinocerebellar ataxia or spinal amyotrophy. Psychotic episodes are also reported [121]. In all forms, brain imaging often reveals cerebral and cerebellar atrophy. Neurons of the whole nervous system are swollen with storage material, consisting in concentric lamellar structures upon ultrastructural examination [122]. Storage also affects the astrocytes. Neuronal loss and gliosis are observed. Ectopic dendritogenesis is another accompanying pathological feature [123]. GM2 accumulates in the brain of Tay–Sachs patients, primarily in the gray matter. Other gangliosides (GM1, GD1a, GD1b, GT1b) are decreased [124–126].

Mutations in the *HEXB* encoding for the β subunit not only affect β-hexosaminidase A (αβ heterodimer) but also β-hexosaminidase B (ββ homodimer that takes part in neutral SLs and oligosaccharides catabolism). This defect leads to Sandhoff disease [127], that is clinically quite undistinguishable from Tay–Sachs disease except that it also features systemic manifestations such as hepatosplenomegaly [128] and some involvement of bones and even the heart [129]. GM2 and GA2 accumulate in the brain, and globosides in visceral organs [127].

*Hexa*-deficient mice display an unexpected phenotype, with no neurological symptoms. This is because, unlike its human counterpart, the murine sialidase could actually ensure some conversion of GM2 into GA2 (which would be then degraded to lactosylceramide by β-hexosaminidase B) [130]. The *Hexb* knockout mouse appears as a better model of human GM2-gangliosidoses as it exhibits a phenotype quite similar to the human disease. Studies performed using this model tend to incriminate neuroinflammation (microglial and astrocyte activation) in neurodegeneration [131,132]. However, in a recent study, correction of the GM2 storage specifically in neurons of *Hexb* knockout mice was sufficient to avoid neurodegeneration and to restore a normal motor behavior, despite the persistence of microglial and macrophage activation [133]. This work supports the idea that neuroinflammation only partially contributes to neuronal cell death.

### 6.3. Defects of glucosylceramide metabolism

While a unique enzyme catalyzes the synthesis of GlcCer from Cer, at least two (possibly three) enzymes cleave GlcCer by removing the β-glucose, which represents the very last degradation step of numerous glycosphingolipids. No genetic defect of GlcCer synthase is known in humans but two neurological diseases are due to mutations in the genes encoding β-glucosylceramidases.

Pathogenic mutations of the *GBA* gene cause Gaucher disease, the most prevalent lysosomal storage disease. This autosomal recessive condition is due to the deficient activity of acid β-glucocerebrosidase (or acid β-glucosidase), a lipid hydrolase encoded by the *GBA1* gene, mapped to 1q21–22 [134]. Over 300 pathogenic mutations have been identified resulting in the accumulation of GlcCer. Gaucher disease is characterized by storage of GlcCer in cells of the reticulo-endothelial system in the liver, spleen and bone marrow. There are three distinct phenotypes, the most common being type 1, which is a chronic, non-neuronopathic disease with onset in childhood or adulthood [135]. Types 2 and 3 are neuronopathic forms with CNS involvement. The distinction between these two types was previously based on the age of onset of neurologic signs and the rate of disease progression but neuropathic Gaucher disease forms seem to represent a phenotypic continuum. In classic type 2 Gaucher disease, onset of symptoms occurs before 2 years of age, manifesting with a rapidly progressive course, limited psychomotor development, and death within the first two years [136,137]. The most frequent initial signs are hyperextension of the neck, swallowing difficulties, and strabismus. Then, provoked asphyxic episodes generally appear, followed by prolonged spontaneous apneas. Generalized seizures, myoclonic epilepsy and progressive microcephaly may be observed. Lung disease is the predominant visceral involvement but hepatosplenomegaly, failure to thrive, thrombocytopenia, and anemia are present. Type 3 Gaucher disease comprises a heterogenous group of patients with mild to severe visceral involvement combined with variable, slowly progressive neurological involvement. Some subtypes have been distinguished based on the occurrence of progressive myoclonic epilepsy or oculomotor apraxia associated with more or less severe systemic involvement [138]. Oculomotor anomalies (horizontal supranuclear gaze palsy) are usually the first neurological sign. Generalized tonic–clonic seizures and cerebellar ataxia, extrapyramidal signs, cognitive regression, or psychiatric disturbance can be observed. Whereas Gaucher patients with at least one p.N370S *GBA* allele do not develop primary neurologic disease, those who carry the

p.L444P substitution tend to have a severe, often neurological form (type 2 or 3) [135,137,139].

A rare variant of Gaucher disease is caused by mutations in the prosaposin (*PSAP*) gene which affects saposin C. This saposin likely favors accessibility of the GlcCer substrate to β-glucocerebrosidase [140]. Mutated saposin C can lead to visceral, non-neuronopathic or type 3-like Gaucher disease.

The neuropathology of neuronopathic Gaucher disease, which is dominated by neuronal cell loss, is not fully understood. GlcCer accumulates in the brain, cerebellum, and cerebrospinal fluid of types 2 and 3 patients [141]. A relative reduction in gangliosides has been observed in all tissues, but GD3 levels were relatively increased in the nervous tissue. While GlcCer storage may underlie the macrophage activation and dysfunction in peripheral tissues, GlcCer excess does not appear critical for the CNS pathology. However, the unacylated derivative of GlcCer may play a key role. Glucosylsphingosine levels were found increased in cerebrum and cerebellum in types 2 and 3 patients [141, 142], as well as in mouse models of neuronopathic Gaucher. This lysolipid may be the culprit as it proved to be toxic on cultured neuronal cells (see Table 1). It has recently been proposed that the receptor-interacting protein kinase-3 (Ripk3) may be critically involved in the non-apoptotic (necroptotic) neuronal cell death and neuroinflammation in Gaucher, and possibly also Krabbe, disease [143]. Whether the accumulated glucosylsphingosine orchestrates this pathway remains to be determined. In addition, of interest is the fact that *GBA1* mutations represent the most important risk factor for developing α-synucleopathies such as Parkinson disease [144]. It is still a matter of debate whether alterations in GlcCer (or Cer) metabolism primarily contribute or initiate the accumulation and aggregation of α-synuclein and other proteins including the amyloid precursor protein [145].

Mutations of the *GBA2* gene, encoding a non-lysosomal β-glucosylceramidase, have been reported very recently to be associated with an autosomal recessive form of progressive cerebellar ataxia [146]. Spasticity initially affects the lower limbs, and is later followed by dysarthria and dysphagia. In some patients, the clinical picture was that of a hereditary spastic paraplegia (SPG46). This phenotype contrasts with the absence of neurological disturbances in mice with disrupted *Gba2* [147]. However, an impairment in the outgrowth of spinal neuron axons has been observed in the zebrafish after inactivation of Gba2 by antisense morpholino oligonucleotides [148]. So far, because no biochemical (e.g., sphingolipidomic) data are available regarding patients with *GBA2* mutations, the pathogenic mechanisms that underlie this disease are unknown. Whether the pathology is related to GlcCer accumulation or lack of production of some Cer species, either directly because of deficient activity of GBA2 or indirectly through effects on other glucosylceramidases remains to be determined.

## 7. Concluding remarks

Since their discovery by Thudichum, brain SLs have been the subject of intense investigation. Insights into their physiological functions have largely benefited from the study of several lysosomal storage disorders that affect the nervous system [149,150]. Further genetic disorders characterized by defective biosynthesis of SLs have been described very recently. Together, these human genetic conditions and their counterparts in murine models [151,152] provide invaluable clues to unravel the roles of SLs in brain physiology and pathology. Nevertheless, because of the structural diversity of SLs and the complexity of their metabolism, the precise nature of the SL that really causes brain dysfunction in many of these disorders is still unclear. The SL, either substrate or product of a deficient enzyme, that exhibits the most prominent quantitative change is often viewed as the culprit. However, the possibility that minor variations in an upstream, downstream or by-product SL (i.e., either excessive or deficient levels) also participate to the pathophysiology of disease cannot currently be ruled out. The identification of such subtle or even secondary changes as well as the elucidation of the mechanisms that underlie the molecular pathogenesis (see [153]) is of utmost importance as it could open new avenues of therapeutic intervention (see [154]) not only for this class of genetic disorders but also possibly for other neurological diseases.

## Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in the online version.

## Acknowledgments

Studies by T. Levade's group were supported by INSERM, Université Paul Sabatier, ANR (SphingoDR program), RITC, LNCC (Equipe Labellisée 2013), CHU Toulouse, and Vaincre les Maladies Lysosomales Foundation.

## References

[1] E. Fahy, D. Cotter, M. Sud, S. Subramaniam, Lipid classification, structures and tools, Biochim. Biophys. Acta 1811 (11) (2011) 637–647.
[2] P.S. Sastry, Lipids of nervous tissue: composition and metabolism, Prog. Lipid Res. 24 (2) (1985) 69–176.
[3] T. Ariga, W.D. Jarvis, R.K. Yu, Role of sphingolipid-mediated cell death in neurodegenerative diseases, J. Lipid Res. 39 (1) (1998) 1–16.
[4] R. Buccoliero, A.H. Futerman, The roles of ceramide and complex sphingolipids in neuronal cell function, Pharmacol. Res. 47 (5) (2003) 409–419.
[5] L. Colombaioni, M. Garcia-Gil, Sphingolipid metabolites in neural signalling and function, Brain Res. Brain Res. Rev. 46 (3) (2004) 328–355.
[6] E.I. Posse de Chaves, Sphingolipids in apoptosis, survival and regeneration in the nervous system, Biochim. Biophys. Acta 1758 (12) (2006) 1995–2015.
[7] T. Okada, T. Kajimoto, S. Jahangeer, S. Nakamura, Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate signalling in central nervous system, Cell. Signal. 21 (1) (2009) 7–13.
[8] N.J. Haughey, V.V. Bandaru, M. Bae, M.P. Mattson, Roles for dysfunctional sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease neuropathogenesis, Biochim. Biophys. Acta 1801 (8) (2010) 878–886.
[9] C.R. Horres, Y.A. Hannun, The roles of neutral sphingomyelinases in neurological pathologies, Neurochem. Res. 37 (6) (2012) 1137–1149.
[10] L. Davies, K. Fassbender, S. Walter, Sphingolipids in neuroinflammation, Handb. Exp. Pharmacol. 216 (2013) 421–430.
[11] H.J. Maccioni, J.L. Daniotti, J.A. Martina, Organization of ganglioside synthesis in the Golgi apparatus, Biochim. Biophys. Acta 1437 (2) (1999) 101–118.
[12] T. Kolter, R.L. Proia, K. Sandhoff, Combinatorial ganglioside biosynthesis, J. Biol. Chem. 277 (29) (2002) 25859–25862.
[13] G. van Echten-Deckert, T. Herget, Sphingolipid metabolism in neural cells, Biochim. Biophys. Acta 1758 (12) (2006) 1978–1994.
[14] R.L. Schnaar, R. Gerardy-Schahn, H. Hildebrandt, Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration, Physiol. Rev. 94 (2) (2014) 461–518.
[15] G. Tettamanti, R. Bassi, P. Viani, L. Riboni, Salvage pathways in glycosphingolipid metabolism, Biochimie 85 (3–4) (2003) 423–437.
[16] T. Kolter, K. Sandhoff, Lysosomal degradation of membrane lipids, FEBS Lett. 584 (9) (2010) 1700–1712.
[17] Y. Pewzner-Jung, S. Ben-Dor, A.H. Futerman, When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)?: insights into the regulation of ceramide synthesis, J. Biol. Chem. 281 (35) (2006) 25001–25005.
[18] A. Teufel, T. Maass, P.R. Galle, N. Malik, The longevity assurance homologue of yeast lag1 (Lass) gene family (review), Int J Mol Med 23 (2) (2009) 135–140.
[19] M. Levy, A.H. Futerman, Mammalian ceramide synthases, IUBMB Life 62 (5) (2010) 347–356.
[20] T.D. Mullen, Y.A. Hannun, L.M. Obeid, Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology, Biochem. J. 441 (3) (2012) 789–802.
[21] N. Vanni, F. Fruscione, E. Ferlazzo, P. Striano, A. Robbiano, M. Traverso, T. Sander, A. Falace, E. Gazzerro, P. Bramanti, et al., Impairment of ceramide synthesis causes a novel progressive myoclonus epilepsy, Ann. Neurol. 76 (2) (2014) 206–212.
[22] L. Zhao, S.D. Spassieva, T.J. Jucius, L.D. Shultz, H.E. Shick, W.B. Macklin, Y.A. Hannun, L.M. Obeid, S.L. Ackerman, A deficiency of ceramide biosynthesis causes cerebellar Purkinje cell neurodegeneration and lipofuscin accumulation, PLoS Genet. 7 (5) (2011) e1002063.
[23] C. Ginkel, D. Hartmann, K. vom Dorp, A. Zlomuzica, H. Farwanah, M. Eckhardt, R. Sandhoff, J. Degen, M. Rabionet, E. Dere, et al., Ablation of neuronal ceramide synthase 1 in mice decreases ganglioside levels and expression of myelin-associated glycoprotein in oligodendrocytes, J. Biol. Chem. 287 (50) (2012) 41888–41902.
[24] M.B. Mosbech, A.S. Olsen, D. Neess, O. Ben-David, L.L. Klitten, J. Larsen, A. Sabers, J. Vissing, J.E. Nielsen, L. Hasholt, et al., Reduced ceramide synthase 2 activity causes progressive myoclonic epilepsy, Ann Clin Transl Neurol 1 (2) (2014) 88–98.
[25] Y. Pewzner-Jung, O. Brenner, S. Braun, E.L. Laviad, S. Ben-Dor, E. Feldmesser, S. Horn-Saban, D. Amann-Zalcenstein, C. Raanan, T. Berkutzki, et al., A critical role for ceramide synthase 2 in liver homeostasis: II. Insights into molecular changes leading to hepatopathy, J. Biol. Chem. 285 (14) (2010) 10911–10923.
[26] Y. Pewzner-Jung, H. Park, E.L. Laviad, L.C. Silva, S. Lahiri, J. Stiban, R. Erez-Roman, B. Brugger, T. Sachsenheimer, F. Wieland, et al., A critical role for ceramide synthase 2

in liver homeostasis: I. Alterations in lipid metabolic pathways, J. Biol. Chem. 285 (14) (2010) 10902–10910.
[27] S. Imgrund, D. Hartmann, H. Farwanah, M. Eckhardt, R. Sandhoff, J. Degen, V. Gieselmann, K. Sandhoff, K. Willecke, Adult ceramide synthase 2 (CERS2)-deficient mice exhibit myelin sheath defects, cerebellar degeneration, and hepatocarcinomas, J. Biol. Chem. 284 (48) (2009) 33549–33560.
[28] O. Ben-David, Y. Pewzner-Jung, O. Brenner, E.L. Laviad, A. Kogot-Levin, I. Weissberg, I.E. Biton, R. Pienik, E. Wang, S. Kelly, et al., Encephalopathy caused by ablation of very long acyl chain ceramide synthesis may be largely due to reduced galactosylceramide levels, J. Biol. Chem. 286 (34) (2011) 30022–30033.
[29] M. Hermansson, R. Kakela, M. Berghall, A.E. Lehesjoki, P. Somerharju, U. Lahtinen, Mass spectrometric analysis reveals changes in phospholipid, neutral sphingolipid and sulfatide molecular species in progressive epilepsy with mental retardation, EPMR, brain: a case study, J. Neurochem. 95 (3) (2005) 609–617.
[30] M. Kuronen, M. Hermansson, O. Manninen, I. Zech, M. Talvitie, T. Laitinen, O. Grohn, P. Somerharju, M. Eckhardt, J.D. Cooper, et al., Galactolipid deficiency in the early pathogenesis of neuronal ceroid lipofuscinosis model Cln8mnd: implications to delayed myelination and oligodendrocyte maturation, Neuropathol. Appl. Neurobiol. 38 (5) (2012) 471–486.
[31] E. Winter, C.P. Ponting, TRAM, LAG1 and CLN8: members of a novel family of lipid-sensing domains? Trends Biochem. Sci. 27 (8) (2002) 381–383.
[32] C. Mao, L.M. Obeid, Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate, Biochim. Biophys. Acta 1781 (9) (2008) 424–434.
[33] T. Levade, K. Sandhoff, H. Schulze, J.A. Medin, Acid ceramidase deficiency: Farber lipogranulomatosis, in: D. Valle (Ed.), Scriver's OMMBID (Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease), McGraw-Hill, New York, 2009 (http://www.ommbid.com).
[34] J. Zhou, M. Tawk, F.D. Tiziano, J. Veillet, M. Bayes, F. Nolent, V. Garcia, S. Servidei, E. Bertini, F. Castro-Giner, et al., Spinal muscular atrophy associated with progressive myoclonic epilepsy is caused by mutations in ASAH1, Am. J. Hum. Genet. 91 (1) (2012) 5–14.
[35] D. Dyment, E. Sell, M. Vanstone, A. Smith, D. Garandeau, V. Garcia, S. Carpentier, E. Le Trionnaire, F. Sabourdy, C. Beaulieu, et al., Evidence for clinical, genetic and biochemical variability in spinal muscular atrophy with progressive myoclonic epilepsy, Clin. Genet. 86 (6) (2014) 558–563.
[36] A.M. Alayoubi, J.C. Wang, B.C. Au, S. Carpentier, V. Garcia, S. Dworski, S. El-Ghamrasni, K.N. Kirouac, M.J. Exertier, Z.J. Xiong, et al., Systemic ceramide accumulation leads to severe and varied pathological consequences, EMBO Mol Med 5 (6) (2013) 827–842.
[37] D. Schnabel, M. Schroder, W. Furst, A. Klein, R. Hurwitz, T. Zenk, J. Weber, K. Harzer, B.C. Paton, A. Poulos, et al., Simultaneous deficiency of sphingolipid activator proteins 1 and 2 is caused by a mutation in the initiation codon of their common gene, J. Biol. Chem. 267 (5) (1992) 3312–3315.
[38] H. Hulkova, M. Cervenkova, J. Ledvinova, M. Tochackova, M. Hrebicek, H. Poupetova, A. Befekadu, L. Berna, B.C. Paton, K. Harzer, et al., A novel mutation in the coding region of the prosaposin gene leads to a complete deficiency of prosaposin and saposins, and is associated with a complex sphingolipidosis dominated by lactosylceramide accumulation, Hum. Mol. Genet. 10 (9) (2001) 927–940.
[39] M. Elleder, M. Jerabkova, A. Befekadu, M. Hrebicek, L. Berna, J. Ledvinova, H. Hulkova, H. Rosewich, N. Schymik, B.C. Paton, et al., Prosaposin deficiency — a rarely diagnosed, rapidly progressing, neonatal neurovisceral lipid storage disease. Report of a further patient, Neuropediatrics 36 (3) (2005) 171–180.
[40] L. Kuchar, J. Ledvinova, M. Hrebicek, H. Myskova, L. Dvorakova, L. Berna, P. Chrastina, B. Asfaw, M. Elleder, M. Petermoller, et al., Prosaposin deficiency and saposin B deficiency (activator-deficient metachromatic leukodystrophy): report on two patients detected by analysis of urinary sphingolipids and carrying novel PSAP gene mutations, Am. J. Med. Genet. A 149A (4) (2009) 613–621.
[41] N. Azuma, J.S. O'Brien, H.W. Moser, Y. Kishimoto, Stimulation of acid ceramidase activity by saposin D, Arch. Biochem. Biophys. 311 (2) (1994) 354–357.
[42] T. Linke, G. Wilkening, F. Sadeghlar, H. Mozcall, K. Bernardo, E. Schuchman, K. Sandhoff, Interfacial regulation of acid ceramidase activity. Stimulation of ceramide degradation by lysosomal lipids and sphingolipid activator proteins, J. Biol. Chem. 276 (8) (2001) 5760–5768.
[43] J. Matsuda, M. Kido, K. Tadano-Aritomi, I. Ishizuka, K. Tominaga, K. Toida, E. Takeda, K. Suzuki, Y. Kuroda, Mutation in saposin D domain of sphingolipid activator protein gene causes urinary system defects and cerebellar Purkinje cell degeneration with accumulation of hydroxy fatty acid-containing ceramide in mouse, Hum. Mol. Genet. 13 (21) (2004) 2709–2723.
[44] M.M. McGovern, A. Aron, S.E. Brodie, R.J. Desnick, M.P. Wasserstein, Natural history of Type A Niemann–Pick disease: possible endpoints for therapeutic trials, Neurology 66 (2) (2006) 228–232.
[45] E.H. Schuchman, R.J. Desnick, Niemann–Pick disease Types A and B: acid sphingomyelinase deficiencies, in: D. Valle (Ed.), Scriver's OMMBID (Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease), McGraw-Hill, New York, 2009 (http://www.ommbid.com).
[46] C. Rodriguez-Lafrasse, M.T. Vanier, Sphingosylphosphorylcholine in Niemann–Pick disease brain: accumulation in type A but not in type B, Neurochem. Res. 24 (2) (1999) 199–205.
[47] K. Horinouchi, S. Erlich, D.P. Perl, K. Ferlinz, C.L. Bisgaier, K. Sandhoff, R.J. Desnick, C.L. Stewart, E.H. Schuchman, Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann–Pick disease, Nat. Genet. 10 (3) (1995) 288–293.
[48] B. Otterbach, W. Stoffel, Acid sphingomyelinase-deficient mice mimic the neurovisceral form of human lysosomal storage disease (Niemann–Pick disease), Cell 81 (7) (1995) 1053–1061.
[49] F. Scandroglio, J.K. Venkata, N. Loberto, S. Prioni, E.H. Schuchman, V. Chigorno, A. Prinetti, S. Sonnino, Lipid content of brain, brain membrane lipid domains, and neurons from acid sphingomyelinase deficient mice, J. Neurochem. 107 (2) (2008) 329–338.
[50] C. Galvan, P.G. Camoletto, F. Cristofani, P.P. Van Veldhoven, M.D. Ledesma, Anomalous surface distribution of glycosyl phosphatidyl inositol-anchored proteins in neurons lacking acid sphingomyelinase, Mol. Biol. Cell 19 (2) (2008) 509–522.
[51] P.G. Camoletto, H. Vara, L. Morando, E. Connell, F.P. Marletto, M. Giustetto, M. Sassoe-Pognetto, P.P. Van Veldhoven, M.D. Ledesma, Synaptic vesicle docking: sphingosine regulates syntaxin1 interaction with Munc18, PLoS One 4 (4) (2009) e5310.
[52] M.D. Ledesma, A. Prinetti, S. Sonnino, E.H. Schuchman, Brain pathology in Niemann Pick disease type A: insights from the acid sphingomyelinase knockout mice, J. Neurochem. 116 (5) (2011) 779–788.
[53] A.I. Arroyo, P.G. Camoletto, L. Morando, M. Sassoe-Pognetto, M. Giustetto, P.P. Van Veldhoven, E.H. Schuchman, M.D. Ledesma, Pharmacological reversion of sphingomyelin-induced dendritic spine anomalies in a Niemann Pick disease type A mouse model, EMBO Mol Med 6 (3) (2014) 398–413.
[54] E. Gabande-Rodriguez, P. Boya, V. Labrador, C.G. Dotti, M.D. Ledesma, High sphingomyelin levels induce lysosomal damage and autophagy dysfunction in Niemann Pick disease type A, Cell Death Differ. 21 (6) (2014) 864–875.
[55] S. Edvardson, H. Hama, A. Shaag, J.M. Gomori, I. Berger, D. Soffer, S.H. Korman, I. Taustein, A. Saada, O. Elpeleg, Mutations in the fatty acid 2-hydroxylase gene are associated with leukodystrophy with spastic paraparesis and dystonia, Am. J. Hum. Genet. 83 (5) (2008) 643–648.
[56] I. Zoller, M. Meixner, D. Hartmann, H. Bussow, R. Meyer, V. Gieselmann, M. Eckhardt, Absence of 2-hydroxylated sphingolipids is compatible with normal neural development but causes late-onset axon and myelin sheath degeneration, J. Neurosci. 28 (39) (2008) 9741–9754.
[57] K.J. Dick, M. Eckhardt, C. Paisan-Ruiz, A.A. Alshehhi, C. Proukakis, N.A. Sibtain, H. Maier, R. Sharifi, M.A. Patton, W. Bashir, et al., Mutation of FA2H underlies a complicated form of hereditary spastic paraplegia (SPG35), Hum. Mutat. 31 (4) (2010) E1251–E1260.
[58] M.C. Kruer, C. Paisan-Ruiz, N. Boddaert, M.Y. Yoon, H. Hama, A. Gregory, A. Malandrini, R.L. Woltjer, A. Munnich, S. Gobin, et al., Defective FA2H leads to a novel form of neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA), Ann. Neurol. 68 (5) (2010) 611–618.
[59] K.A. Potter, M.J. Kern, G. Fullbright, J. Bielawski, S.S. Scherer, S.W. Yum, J.J. Li, H. Cheng, X. Han, J.K. Venkata, et al., Central nervous system dysfunction in a mouse model of FA2H deficiency, Glia 59 (7) (2011) 1009–1021.
[60] H. Hama, Fatty acid 2-Hydroxylation in mammalian sphingolipid biology, Biochim. Biophys. Acta 1801 (4) (2010) 405–414.
[61] J. Austin, D. McAfee, L. Shearer, Metachromatic form of diffuse cerebral sclerosis. Iv. Low sulfatase activity in the urine of nine living patients with metachromatic leukodystrophy (Mld), Arch. Neurol. 12 (1965) 447–455.
[62] E. Mehl, H. Jatzkewitz, Evidence for the genetic block in metachromatic leucodystrophy (Ml), Biochem. Biophys. Res. Commun. 19 (1965) 407–411.
[63] V. Gieselmann, I. Krägeloh-Mann, Metachromatic leukodystrophy, in: D. Valle (Ed.), Scriver's OMMBID (Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease), McGraw-Hill, New York, 2009 (http://www.ommbid.com).
[64] K. Suzuki, Y. Suzuki, Globoid cell leucodystrophy (Krabbe's disease): deficiency of galactocerebroside beta-galactosidase, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 66 (2) (1970) 302–309.
[65] B. Hagberg, Clinical aspects of globoid cell and metachromatic leukodystrophies, Birth Defects Orig Artic Ser 7 (1) (1971) 103–112.
[66] G. Fischer, H. Jatzkewitz, The activator of cerebroside sulphatase. Binding studies with enzyme and substrate demonstrating the detergent function of the activator protein, Biochim. Biophys. Acta 481 (2) (1977) 561–572.
[67] K.A. Kretz, G.S. Carson, S. Morimoto, Y. Kishimoto, A.L. Fluharty, J.S. O'Brien, Characterization of a mutation in a family with saposin B deficiency: a glycosylation site defect, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87 (7) (1990) 2541–2544.
[68] M.A. Rafi, X.L. Zhang, G. DeGala, D.A. Wenger, Detection of a point mutation in sphingolipid activator protein-1 mRNA in patients with a variant form of metachromatic leukodystrophy, Biochem. Biophys. Res. Commun. 166 (2) (1990) 1017–1023.
[69] V. Gieselmann, U. Matzner, B. Hess, R. Lullmann-Rauch, R. Coenen, D. Hartmann, R. D'Hooge, P. DeDeyn, G. Nagels, Metachromatic leukodystrophy: molecular genetics and an animal model, J. Inherit. Metab. Dis. 21 (5) (1998) 564–574.
[70] B. Rosengren, P. Fredman, J.E. Mansson, L. Svennerholm, Lysosulfatide (galactosylsphingosine-3-O-sulfate) from metachromatic leukodystrophy and normal human brain, J. Neurochem. 52 (4) (1989) 1035–1041.
[71] K. Toda, T. Kobayashi, I. Goto, T. Kurokawa, K. Ogomori, Accumulation of lysosulfatide (sulfogalactosylsphingosine) in tissues of a boy with metachromatic leukodystrophy, Biochem. Biophys. Res. Commun. 159 (2) (1989) 605–611.
[72] B. Hess, P. Saftig, D. Hartmann, R. Coenen, R. Lullmann-Rauch, H.H. Goebel, M. Evers, K. von Figura, R. D'Hooge, G. Nagels, et al., Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (25) (1996) 14821–14826.
[73] M. Eckhardt, K.K. Hedayati, J. Pitsch, R. Lullmann-Rauch, H. Beck, S.N. Fewou, V. Gieselmann, Sulfatide storage in neurons causes hyperexcitability and axonal degeneration in a mouse model of metachromatic leukodystrophy, J. Neurosci. 27 (34) (2007) 9009–9021.
[74] H. Ramakrishnan, K.K. Hedayati, R. Lullmann-Rauch, C. Wessig, S.N. Fewou, H. Maier, H.H. Goebel, V. Gieselmann, M. Eckhardt, Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy, J. Neurosci. 27 (35) (2007) 9482–9490.

[75] V. Gieselmann, I. Krageloh-Mann, Metachromatic leukodystrophy — an update, Neuropediatrics 41 (1) (2010) 1–6.
[76] T. Miyatake, K. Suzuki, Galactosylsphingosine galactosyl hydrolase in rat brain: probable identity with galactosylceramide galactosyl hydrolase, J. Neurochem. 22 (2) (1974) 231–237.
[77] T. Kobayashi, T. Yamanaka, J.M. Jacobs, F. Teixeira, K. Suzuki, The Twitcher mouse: an enzymatically authentic model of human globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease), Brain Res. 202 (2) (1980) 479–483.
[78] D.A. Wenger, M.L. Escolar, P. Luzi, M.A. Rafi, Krabbe disease (Globoid Cell Leukodystrophy), in: D. Valle (Ed.), Scriver's OMMBID (Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease), McGraw-Hill, New York, 2009 (http://www.ommbid.com).
[79] L.C. Castelvetri, M.I. Givogri, H. Zhu, B. Smith, A. Lopez-Rosas, X. Qiu, R. van Breemen, E.R. Bongarzone, Axonopathy is a compounding factor in the pathogenesis of Krabbe disease, Acta Neuropathol. 122 (1) (2011) 35–48.
[80] L. Svennerholm, M.T. Vanier, J.E. Mansson, Krabbe disease: a galactosylsphingosine (psychosine) lipidosis, J. Lipid Res. 21 (1) (1980) 53–64.
[81] H. Igisu, K. Suzuki, Progressive accumulation of toxic metabolite in a genetic leukodystrophy, Science 224 (4650) (1984) 753–755.
[82] E. Haq, S. Giri, I. Singh, A.K. Singh, Molecular mechanism of psychosine-induced cell death in human oligodendrocyte cell line, J. Neurochem. 86 (6) (2003) 1428–1440.
[83] M. Zaka, D.A. Wenger, Psychosine-induced apoptosis in a mouse oligodendrocyte progenitor cell line is mediated by caspase activation, Neurosci. Lett. 358 (3) (2004) 205–209.
[84] J.S. Won, J. Kim, M.K. Paintlia, I. Singh, A.K. Singh, Role of endogenous psychosine accumulation in oligodendrocyte differentiation and survival: implication for Krabbe disease, Brain Res. 1508 (2013) 44–52.
[85] M. Belleri, R. Ronca, D. Coltrini, B. Nico, D. Ribatti, P.L. Poliani, A. Giacomini, P. Alessi, S. Marchesini, M.B. Santos, et al., Inhibition of angiogenesis by beta-galactosylceramidase deficiency in globoid cell leukodystrophy, Brain 136 (Pt 9) (2013) 2859–2875.
[86] A.B. White, M.I. Givogri, A. Lopez-Rosas, H. Cao, R. van Breemen, G. Thinakaran, E.R. Bongarzone, Psychosine accumulates in membrane microdomains in the brain of krabbe patients, disrupting the raft architecture, J. Neurosci. 29 (19) (2009) 6068–6077.
[87] J.A. Hawkins-Salsbury, A.R. Parameswar, X. Jiang, P.H. Schlesinger, E. Bongarzone, D.S. Ory, A.V. Demchenko, M.S. Sands, Psychosine, the cytotoxic sphingolipid that accumulates in globoid cell leukodystrophy, alters membrane architecture, J. Lipid Res. 54 (12) (2013) 3303–3311.
[88] S. Giri, M. Khan, N. Nath, I. Singh, A.K. Singh, The role of AMPK in psychosine mediated effects on oligodendrocytes and astrocytes: implication for Krabbe disease, J. Neurochem. 105 (5) (2008) 1820–1833.
[89] M. Khan, E. Haq, S. Giri, I. Singh, A.K. Singh, Peroxisomal participation in psychosine-mediated toxicity: implications for Krabbe's disease, J. Neurosci. Res. 80 (6) (2005) 845–854.
[90] B.R. Smith, M.B. Santos, M.S. Marshall, L. Cantuti-Castelvetri, A. Lopez-Rosas, G. Li, R. van Breemen, K.I. Claycomb, J.I. Gallea, M.S. Celej, et al., Neuronal inclusions of alpha-synuclein contribute to the pathogenesis of Krabbe disease, J. Pathol. 232 (5) (2014) 509–521.
[91] R. Spiegel, G. Bach, V. Sury, G. Mengistu, B. Meidan, S. Shalev, Y. Shneor, H. Mandel, M. Zeigler, A mutation in the saposin A coding region of the prosaposin gene in an infant presenting as Krabbe disease: first report of saposin A deficiency in humans, Mol. Genet. Metab. 84 (2) (2005) 160–166.
[92] J. Matsuda, M.T. Vanier, Y. Saito, J. Tohyama, K. Suzuki, K. Suzuki, A mutation in the saposin A domain of the sphingolipid activator protein (prosaposin) gene results in a late-onset, chronic form of globoid cell leukodystrophy in the mouse, Hum. Mol. Genet. 10 (11) (2001) 1191–1199.
[93] J. Matsuda, A. Yoneshige, K. Suzuki, The function of sphingolipids in the nervous system: lessons learnt from mouse models of specific sphingolipid activator protein deficiencies, J. Neurochem. 103 (Suppl. 1) (2007) 32–38.
[94] M.A. Simpson, H. Cross, C. Proukakis, D.A. Priestman, D.C. Neville, G. Reinkensmeier, H. Wang, M. Wiznitzer, K. Gurtz, A. Verganelaki, et al., Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase, Nat. Genet. 36 (11) (2004) 1225–1229.
[95] K. Fragaki, S. Ait-El-Mkadem, A. Chaussenot, C. Gire, R. Mengual, L. Bonesso, M. Beneteau, J.E. Ricci, V. Desquiret-Dumas, V. Procaccio, et al., Refractory epilepsy and mitochondrial dysfunction due to GM3 synthase deficiency, Eur. J. Hum. Genet. 21 (5) (2013) 528–534.
[96] H. Wang, A. Bright, B. Xin, J.R. Bockoven, A.S. Paller, Cutaneous dyspigmentation in patients with ganglioside GM3 synthase deficiency, Am. J. Med. Genet. A 161A (4) (2013) 875–879.
[97] L. Boccuto, K. Aoki, H. Flanagan-Steet, C.F. Chen, X. Fan, F. Bartel, M. Petukh, A. Pittman, R. Saul, A. Chaubey, et al., A mutation in a ganglioside biosynthetic enzyme, ST3GAL5, results in salt & pepper syndrome, a neurocutaneous disorder with altered glycolipid and glycoprotein glycosylation, Hum. Mol. Genet. 23 (2) (2014) 418–433.
[98] T. Yamashita, A. Hashiramoto, M. Haluzik, H. Mizukami, S. Beck, A. Norton, M. Kono, S. Tsuji, J.L. Daniotti, N. Werth, et al., Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 (6) (2003) 3445–3449.
[99] K. Niimi, C. Nishioka, T. Miyamoto, E. Takahashi, I. Miyoshi, C. Itakura, T. Yamashita, Impairment of neuropsychological behaviors in ganglioside GM3-knockout mice, Biochem. Biophys. Res. Commun. 406 (4) (2011) 524–528.
[100] M. Yoshikawa, S. Go, K. Takasaki, Y. Kakazu, M. Ohashi, M. Nagafuku, K. Kabayama, J. Sekimoto, S. Suzuki, K. Takaiwa, et al., Mice lacking ganglioside GM3 synthase exhibit complete hearing loss due to selective degeneration of the organ of Corti, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106 (23) (2009) 9483–9488.
[101] A. Boukhris, R. Schule, J.L. Loureiro, C.M. Lourenco, E. Mundwiller, M.A. Gonzalez, P. Charles, J. Gauthier, I. Rekik, R.F. Acosta Lebrigio, et al., Alteration of ganglioside biosynthesis responsible for complex hereditary spastic paraplegia, Am. J. Hum. Genet. 93 (1) (2013) 118–123.
[102] P.A. Wilkinson, M.A. Simpson, L. Bastaki, H. Patel, J.A. Reed, K. Kalidas, E. Samilchuk, R. Khan, T.T. Warner, A.H. Crosby, A new locus for autosomal recessive complicated hereditary spastic paraplegia (SPG26) maps to chromosome 12p11.1–12q14, J. Med. Genet. 42 (1) (2005) 80–82.
[103] G.V. Harlalka, A. Lehman, B. Chioza, E.L. Baple, R. Maroofian, H. Cross, A. Sreekantan-Nair, D.A. Priestman, S. Al-Turki, M.E. McEntagart, et al., Mutations in B4GALNT1 (GM2 synthase) underlie a new disorder of ganglioside biosynthesis, Brain 136 (Pt 12) (2013) 3618–3624.
[104] K. Takamiya, A. Yamamoto, K. Furukawa, S. Yamashiro, M. Shin, M. Okada, S. Fukumoto, M. Haraguchi, N. Takeda, K. Fujimura, et al., Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (20) (1996) 10662–10667.
[105] K.A. Sheikh, J. Sun, Y. Liu, H. Kawai, T.O. Crawford, R.L. Proia, J.W. Griffin, R.L. Schnaar, Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96 (13) (1999) 7532–7537.
[106] S. Chiavegatto, J. Sun, R.J. Nelson, R.L. Schnaar, A functional role for complex gangliosides: motor deficits in GM2/GD2 synthase knockout mice, Exp. Neurol. 166 (2) (2000) 227–234.
[107] N. Brunetti-Pierri, F. Scaglia, GM1 gangliosidosis: review of clinical, molecular, and therapeutic aspects, Mol. Genet. Metab. 94 (4) (2008) 391–396.
[108] K. Suzuki, G.C. Chen, Brain ceramide hexosides in Tay–Sachs disease and generalized gangliosidosis (GM1-gangliosidosis), J. Lipid Res. 8 (2) (1967) 105–113.
[109] K. Suzuki, S. Kamoshita, Chemical pathology of Gm1-gangliosidosis (generalized gangliosidosis), J. Neuropathol. Exp. Neurol. 28 (1) (1969) 25–73.
[110] C.N. Hahn, Martin M. del Pilar, M. Schroder, M.T. Vanier, Y. Hara, K. Suzuki, K. Suzuki, A. d'Azzo, Generalized CNS disease and massive GM1-ganglioside accumulation in mice defective in lysosomal acid beta-galactosidase, Hum. Mol. Genet. 6 (2) (1997) 205–211.
[111] A. Tessitore, P.M.M. del, R. Sano, Y. Ma, L. Mann, A. Ingrassia, E.D. Laywell, D.A. Steindler, L.M. Hendershot, A. d'Azzo, GM1-ganglioside-mediated activation of the unfolded protein response causes neuronal death in a neurodegenerative gangliosidosis, Mol. Cell 15 (5) (2004) 753–766.
[112] A. d'Azzo, A. Tessitore, R. Sano, Gangliosides as apoptotic signals in ER stress response, Cell Death Differ. 13 (3) (2006) 404–414.
[113] A. Takamura, K. Higaki, K. Kajimaki, S. Otsuka, H. Ninomiya, J. Matsuda, K. Ohno, Y. Suzuki, E. Nanba, Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine G(M1)-gangliosidosis, Biochem. Biophys. Res. Commun. 367 (3) (2008) 616–622.
[114] R. Sano, I. Annunziata, A. Patterson, S. Moshiach, E. Gomero, J. Opferman, M. Forte, A. d'Azzo, GM1-ganglioside accumulation at the mitochondria-associated ER membranes links ER stress to Ca(2+)-dependent mitochondrial apoptosis, Mol. Cell 36 (3) (2009) 500–511.
[115] M. Jeyakumar, R. Thomas, E. Elliot-Smith, D.A. Smith, A.C. van der Spoel, A. d'Azzo, V.H. Perry, T.D. Butters, R.A. Dwek, F.M. Platt, Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis, Brain 126 (Pt 4) (2003) 974–987.
[116] J.P. van der Voorn, W. Kamphorst, M.S. van der Knaap, J.M. Powers, The leukoencephalopathy of infantile GM1 gangliosidosis: oligodendrocytic loss and axonal dysfunction, Acta Neuropathol. 107 (6) (2004) 539–545.
[117] M. Di Rocco, A. Rossi, G. Parenti, A.E. Allegri, M. Filocamo, A. Pessagno, P. Tortori-Donati, C. Minetti, R. Biancheri, Different molecular mechanisms leading to white matter hypomyelination in infantile onset lysosomal disorders, Neuropediatrics 36 (4) (2005) 265–269.
[118] M.M. Kaback, Population-based genetic screening for reproductive counseling: the Tay–Sachs disease model, Eur. J. Pediatr. 159 (Suppl. 3) (2000) S192–S195.
[119] R.A. Gravel, M.M. Kaback, R.L. Proia, K. Sandhoff, K. Suzuki, K. Suzuki, The GM2 gangliosidoses, in: D. Valle (Ed.), Scriver's OMMBID (Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease), McGraw-Hill, New York, 2009 (http://www.ommbid.com).
[120] G.H. Maegawa, T. Stockley, M. Tropak, B. Banwell, S. Blaser, F. Kok, R. Giugliani, D. Mahuran, J.T. Clarke, The natural history of juvenile or subacute GM2 gangliosidosis: 21 new cases and literature review of 134 previously reported, Pediatrics 118 (5) (2006) e1550–e1562.
[121] O. Neudorfer, G.M. Pastores, B.J. Zeng, J. Gianutsos, C.M. Zaroff, E.H. Kolodny, Late-onset Tay–Sachs disease: phenotypic characterization and genotypic correlations in 21 affected patients, Genet Med 7 (2) (2005) 119–123.
[122] R.D. Terry, M. Weiss, Studies in Tay–Sachs disease. II. Ultrastructure of the cerebrum, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 22 (1963) 18–55.
[123] D.P. Purpura, Ectopic dendritic growth in mature pyramidal neurones in human ganglioside storage disease, Nature 276 (5687) (1978) 520–521.
[124] K. Sandhoff, K. Harzer, W. Wassle, H. Jatzkewitz, Enzyme alterations and lipid storage in three variants of Tay–Sachs disease, J. Neurochem. 18 (12) (1971) 2469–2489.
[125] B. Rosengren, J.E. Mansson, L. Svennerholm, Composition of gangliosides and neutral glycosphingolipids of brain in classical Tay–Sachs and Sandhoff disease: more lyso-GM2 in Sandhoff disease? J. Neurochem. 49 (3) (1987) 834–840.
[126] R.K. Yu, T. Itoh, H.C. Yohe, L.J. Macala, Characterization of some minor gangliosides in Tay–Sachs brains, Brain Res. 275 (1) (1983) 47–52.
[127] K. Sandhoff, U. Andreae, H. Jatzkewitz, Deficient hexozaminidase activity in an exceptional case of Tay–Sachs disease with additional storage of kidney globoside in visceral organs, Life Sci. 7 (6) (1968) 283–288.

[128] J. Gravel, M. Lallier, L. Garel, P. Brochu, J. Champagne, F. Alvarez, Primary non-Hodgkin lymphoma of the extrahepatic biliary tract and gallbladder in a child, J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 32 (5) (2001) 598–601.
[129] P. Venugopalan, S.N. Joshi, Cardiac involvement in infantile Sandhoff disease, J. Paediatr. Child Health 38 (1) (2002) 98–100.
[130] K. Sango, S. Yamanaka, A. Hoffmann, Y. Okuda, A. Grinberg, H. Westphal, M.P. McDonald, J.N. Crawley, K. Sandhoff, K. Suzuki, et al., Mouse models of Tay–Sachs and Sandhoff diseases differ in neurologic phenotype and ganglioside metabolism, Nat. Genet. 11 (2) (1995) 170–176.
[131] R. Wada, C.J. Tifft, R.L. Proia, Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97 (20) (2000) 10954–10959.
[132] Y.P. Wu, R.L. Proia, Deletion of macrophage-inflammatory protein 1 alpha retards neurodegeneration in Sandhoff disease mice, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101 (22) (2004) 8425–8430.
[133] S. Kyrkanides, S.M. Brouxhon, R.H. Tallents, J.N. Miller, J.A. Olschowka, M.K. O'Banion, Conditional expression of human beta-hexosaminidase in the neurons of Sandhoff disease rescues mice from neurodegeneration but not neuroinflammation, J. Neuroinflammation 9 (2012) 186.
[134] G.A. Grabowski, S. Gatt, M. Horowitz, Acid beta-glucosidase: enzymology and molecular biology of Gaucher disease, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 25 (6) (1990) 385–414.
[135] G.A. Grabowski, Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease, Lancet 372 (9645) (2008) 1263–1271.
[136] C. Mignot, D. Doummar, I. Maire, T.B. De Villemeur, French Type 2 Gaucher Disease Study G, Type 2 Gaucher disease: 15 new cases and review of the literature, Brain Dev. 28 (1) (2006) 39–48.
[137] G.M. Pastores, Neuropathic Gaucher disease, Wien. Med. Wochenschr. 160 (23–24) (2010) 605–608.
[138] I. Kraoua, F. Sedel, C. Caillaud, R. Froissart, J. Stirnemann, G. Chaurand, H. Flodrops, S. Tari, I. Gourfinkel-An, S. Mathieu, et al., A French experience of type 3 Gaucher disease: phenotypic diversity and neurological outcome of 10 patients, Brain Dev. 33 (2) (2011) 131–139.
[139] A. Tylki-Szymanska, A. Vellodi, A. El-Beshlawy, J.A. Cole, E. Kolodny, Neuronopathic Gaucher disease: demographic and clinical features of 131 patients enrolled in the International Collaborative Gaucher Group Neurological Outcomes Subregistry, J. Inherit. Metab. Dis. 33 (4) (2010) 339–346.
[140] R.J. Tamargo, A. Velayati, E. Goldin, E. Sidransky, The role of saposin C in Gaucher disease, Mol. Genet. Metab. 106 (3) (2012) 257–263.
[141] O. Nilsson, G. Hakansson, S. Dreborg, C.G. Groth, L. Svennerholm, Increased cerebroside concentration in plasma and erythrocytes in Gaucher disease: significant differences between type I and type III, Clin. Genet. 22 (5) (1982) 274–279.
[142] E. Orvisky, J.K. Park, M.E. LaMarca, E.I. Ginns, B.M. Martin, N. Tayebi, E. Sidransky, Glucosylsphingosine accumulation in tissues from patients with Gaucher disease: correlation with phenotype and genotype, Mol. Genet. Metab. 76 (4) (2002) 262–270.
[143] E.B. Vitner, R. Salomon, T. Farfel-Becker, A. Meshcheriakova, M. Ali, A.D. Klein, F.M. Platt, T.M. Cox, A.H. Futerman, RIPK3 as a potential therapeutic target for Gaucher's disease, Nat. Med. 20 (2) (2014) 204–208.
[144] M.S. Beavan, A.H. Schapira, Glucocerebrosidase mutations and the pathogenesis of Parkinson disease, Ann. Med. 45 (8) (2013) 511–521.
[145] Y.H. Xu, K. Xu, Y. Sun, B. Liou, B. Quinn, R.H. Li, L. Xue, W. Zhang, K.D. Setchell, D. Witte, et al., Multiple pathogenic proteins implicated in neuronopathic Gaucher disease mice, Hum. Mol. Genet. 23 (15) (2014) 3943–3957.
[146] M.B. Hammer, G. Eleuch-Fayache, L.V. Schottlaender, H. Nehdi, J.R. Gibbs, S.K. Arepalli, S.B. Chong, D.G. Hernandez, A. Sailer, G. Liu, et al., Mutations in GBA2 cause autosomal–recessive cerebellar ataxia with spasticity, Am. J. Hum. Genet. 92 (2) (2013) 245–251.
[147] Y. Yildiz, H. Matern, B. Thompson, J.C. Allegood, R.L. Warren, D.M. Ramirez, R.E. Hammer, F.K. Hamra, S. Matern, D.W. Russell, Mutation of beta-glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility, J. Clin. Invest. 116 (11) (2006) 2985–2994.
[148] E. Martin, R. Schule, K. Smets, A. Rastetter, A. Boukhris, J.L. Loureiro, M.A. Gonzalez, E. Mundwiller, T. Deconinck, M. Wessner, et al., Loss of function of glucocerebrosidase GBA2 is responsible for motor neuron defects in hereditary spastic paraplegia, Am. J. Hum. Genet. 92 (2) (2013) 238–244.
[149] A.H. Futerman, G. van Meer, The cell biology of lysosomal storage disorders, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5 (7) (2004) 554–565.
[150] T.M. Cox, M.B. Cachon-Gonzalez, The cellular pathology of lysosomal diseases, J. Pathol. 226 (2) (2012) 241–254.
[151] F. Sabourdy, B. Kedjouar, S.C. Sorli, S. Colie, D. Milhas, Y. Salma, T. Levade, Functions of sphingolipid metabolism in mammals — lessons from genetic defects, Biochim. Biophys. Acta 1781 (4) (2008) 145–183.
[152] Y.H. Xu, S. Barnes, Y. Sun, G.A. Grabowski, Multi-system disorders of glycosphingolipid and ganglioside metabolism, J. Lipid Res. 51 (7) (2010) 1643–1675.
[153] E.B. Vitner, F.M. Platt, A.H. Futerman, Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases, J. Biol. Chem. 285 (27) (2010) 20423–20427.
[154] F.M. Platt, Sphingolipid lysosomal storage disorders, Nature 510 (7503) (2014) 68–75.
[155] A.N. Moore, A.W. Kampfl, X. Zhao, R.L. Hayes, P.K. Dash, Sphingosine-1-phosphate induces apoptosis of cultured hippocampal neurons that requires protein phosphatases and activator protein-1 complexes, Neuroscience 94 (2) (1999) 405–415.
[156] K. Yamagata, M. Tagami, Y. Torii, F. Takenaga, S. Tsumagari, S. Itoh, Y. Yamori, Y. Nara, Sphingosine 1-phosphate induces the production of glial cell line-derived neurotrophic factor and cellular proliferation in astrocytes, Glia 41 (2) (2003) 199–206.
[157] A. Furukawa, K. Kita, M. Toyomoto, S. Fujii, S. Inoue, K. Hayashi, K. Ikeda, Production of nerve growth factor enhanced in cultured mouse astrocytes by glycerophospholipids, sphingolipids, and their related compounds, Mol. Cell. Biochem. 305 (1–2) (2007) 27–34.
[158] J. Van Brocklyn, C. Letterle, P. Snyder, T. Prior, Sphingosine-1-phosphate stimulates human glioma cell proliferation through Gi-coupled receptors: role of ERK MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase beta, Cancer Lett. 181 (2) (2002) 195–204.
[159] V. Anelli, C.R. Gault, A.J. Snider, L.M. Obeid, Role of sphingosine kinase-1 in paracrine/transcellular angiogenesis and lymphangiogenesis in vitro, FASEB J. 24 (8) (2010) 2727–2738.
[160] A. Kimura, T. Ohmori, R. Ohkawa, S. Madoiwa, J. Mimuro, T. Murakami, E. Kobayashi, Y. Hoshino, Y. Yatomi, Y. Sakata, Essential roles of sphingosine 1-phosphate/S1P1 receptor axis in the migration of neural stem cells toward a site of spinal cord injury, Stem Cells 25 (1) (2007) 115–124.
[161] V.R. Silva, T.O. Micheletti, G.D. Pimentel, C.K. Katashima, L. Lenhare, J. Morari, M.C. Mendes, D.S. Razolli, G.Z. Rocha, C.T. de Souza, et al., Hypothalamic S1P/S1PR1 axis controls energy homeostasis, Nat. Commun. 5 (2014) 4859.
[162] G. Marfia, R. Campanella, S.E. Navone, C. Di Vito, E. Riccitelli, L.A. Hadi, A. Bornati, G. de Rezende, P. Giussani, C. Tringali, et al., Autocrine/paracrine sphingosine-1-phosphate fuels proliferative and stemness qualities of glioblastoma stem cells, Glia 62 (12) (2014) 1968–1981.
[163] S. Shirao, S. Kashiwagi, M. Sato, S. Miwa, F. Nakao, T. Kurokawa, N. Todoroki-Ikeda, K. Mogami, Y. Mizukami, S. Kuriyama, et al., Sphingosylphosphorylcholine is a novel messenger for Rho-kinase-mediated $Ca^{2+}$ sensitization in the bovine cerebral artery: unimportant role for protein kinase C, Circ. Res. 91 (2) (2002) 112–119.
[164] D.M. Hodgson, A.N. Taylor, Z. Zhang, A. Rosenberg, Lysosphingomyelin prevents behavioral aberrations and hippocampal neuron loss induced by the metabotropic glutamate receptor agonist quisqualate, Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 23 (5) (1999) 877–892.
[165] A. Ignatov, J. Lintzel, I. Hermans-Borgmeyer, H.J. Kreienkamp, P. Joost, S. Thomsen, A. Methner, H.C. Schaller, Role of the G-protein-coupled receptor GPR12 as high-affinity receptor for sphingosylphosphorylcholine and its expression and function in brain development, J. Neurosci. 23 (3) (2003) 907–914.
[166] N. Chiulli, F. Codazzi, A. Di Cesare, C. Gravaghi, D. Zacchetti, F. Grohovaz, Sphingosylphosphocholine effects on cultured astrocytes reveal mechanisms potentially involved in neurotoxicity in Niemann–Pick type A disease, Eur. J. Neurosci. 26 (4) (2007) 875–881.
[167] A. Titievsky, I. Titievskaya, M. Pasternack, K. Kaila, K. Tornquist, Sphingosine inhibits voltage-operated calcium channels in GH4C1 cells, J. Biol. Chem. 273 (1) (1998) 242–247.
[168] T. Kanno, T. Nishizaki, Sphingosine induces apoptosis in hippocampal neurons and astrocytes by activating caspase-3/-9 via a mitochondrial pathway linked to SDK/14-3-3 protein/Bax/cytochrome c, J. Cell. Physiol. 226 (9) (2011) 2329–2337.
[169] D.M. Hodgson, A.N. Taylor, Z. Zhang, A. Rosenberg, Psychosine blocks quisqualate-induced glutamate excitotoxicity in hippocampal CA sector neurons, Brain Res. 802 (1–2) (1998) 1–8.
[170] M. Jatana, S. Giri, A.K. Singh, Apoptotic positive cells in Krabbe brain and induction of apoptosis in rat C6 glial cells by psychosine, Neurosci. Lett. 330 (2) (2002) 183–187.
[171] L. Cantuti Castelvetri, M.I. Givogri, A. Hebert, B. Smith, Y. Song, A. Kaminska, A. Lopez-Rosas, G. Morfini, G. Pigino, M. Sands, et al., The sphingolipid psychosine inhibits fast axonal transport in Krabbe disease by activation of GSK3beta and deregulation of molecular motors, J. Neurosci. 33 (24) (2013) 10048–10056.
[172] E. Lloyd-Evans, D. Pelled, C. Riebeling, J. Bodennec, A. de-Morgan, H. Waller, R. Schiffmann, A.H. Futerman, Glucosylceramide and glucosylsphingosine modulate calcium mobilization from brain microsomes via different mechanisms, J. Biol. Chem. 278 (26) (2003) 23594–23599.
[173] U.H. Schueler, T. Kolter, C.R. Kaneski, J.K. Blusztajn, M. Herkenham, K. Sandhoff, R.O. Brady, Toxicity of glucosylsphingosine (glucopsychosine) to cultured neuronal cells: a model system for assessing neuronal damage in Gaucher disease type 2 and 3, Neurobiol. Dis. 14 (3) (2003) 595–601.
[174] L. Riboni, A. Prinetti, R. Bassi, A. Caminiti, G. Tettamanti, A mediator role of ceramide in the regulation of neuroblastoma Neuro2a cell differentiation, J. Biol. Chem. 270 (45) (1995) 26868–26875.
[175] I. Galve-Roperh, C. Sanchez, M.L. Cortes, T. Gomez del Pulgar, M. Izquierdo, M. Guzman, Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation, Nat. Med. 6 (3) (2000) 313–319.
[176] Y. Chen, I. Ginis, J.M. Hallenbeck, The protective effect of ceramide in immature rat brain hypoxia–ischemia involves up-regulation of bcl-2 and reduction of TUNEL-positive cells, J. Cereb. Blood Flow Metab. 21 (1) (2001) 34–40.
[177] S. Daido, T. Kanzawa, A. Yamamoto, H. Takeuchi, Y. Kondo, S. Kondo, Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells, Cancer Res. 64 (12) (2004) 4286–4293.
[178] M. Salazar, A. Carracedo, I.J. Salanueva, S. Hernandez-Tiedra, M. Lorente, A. Egia, P. Vazquez, C. Blazquez, S. Torres, S. Garcia, et al., Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells, J. Clin. Invest. 119 (5) (2009) 1359–1372.
[179] B.M. Altura, A. Gebrewold, T. Zheng, B.T. Altura, Sphingomyelinase and ceramide analogs induce vasoconstriction and leukocyte-endothelial interactions in cerebral venules in the intact rat brain: Insight into mechanisms and possible relation to brain injury and stroke, Brain Res. Bull. 58 (3) (2002) 271–278.
[180] E. Gulbins, M. Palmada, M. Reichel, A. Luth, C. Bohmer, D. Amato, C.P. Muller, C.H. Tischbirek, T.W. Groemer, G. Tabatabai, et al., Acid sphingomyelinase-ceramide system mediates effects of antidepressant drugs, Nat. Med. 19 (7) (2013) 934–938.

[181] V. Kota, V.M. Dhople, G. Fullbright, N.M. Smythe, Z.M. Szulc, A. Bielawska, H. Hama, 2′-hydroxy C16-ceramide induces apoptosis-associated proteomic changes in C6 glioma cells, J. Proteome Res. 12 (10) (2013) 4366–4375.
[182] M. Favaron, H. Manev, H. Alho, M. Bertolino, B. Ferret, A. Guidotti, E. Costa, Gangliosides prevent glutamate and kainate neurotoxicity in primary neuronal cultures of neonatal rat cerebellum and cortex, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85 (19) (1988) 7351–7355.
[183] L. Barrier, G. Page, S. Barc, A. Piriou, J. Portoukalian, Sulfatide and GM1 ganglioside modulate the high-affinity dopamine uptake in rat striatal synaptosomes: evidence for the involvement of their ionic charges, Neurochem. Int. 42 (4) (2003) 305–313.
[184] J. Prendergast, G.K. Umanah, S.W. Yoo, O. Lagerlof, M.G. Motari, R.N. Cole, R.L. Huganir, T.M. Dawson, V.L. Dawson, R.L. Schnaar, Ganglioside regulation of AMPA receptor trafficking, J. Neurosci. 34 (39) (2014) 13246–13258.
[185] S.U. Walkley, M. Zervas, S. Wiseman, Gangliosides as modulators of dendritogenesis in normal and storage disease-affected pyramidal neurons, Cereb. Cortex 10 (10) (2000) 1028–1037.

# Gaucher disease to rescue Parkinson disease: from bed to bench.

Leonardo Astudillo [1,2,3], MD
Thierry Levade [1,2,4], MD, PhD
Gregory A. Grabowski [5], MD
[1] Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR1037, [2] Equipe Labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer 2013, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Université de Toulouse, [3] Service de Médecine Interne, CHU Purpan, Toulouse, France, [4] Laboratoire de Biochimie Métabolique, Institut Fédératif de Biologie, CHU Purpan, Toulouse, France , [5] Synageva BioPharma Corp., Lexington, MA, USA

**Corresponding author:**
Leonardo Astudillo, MD
INSERM UMR1037, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), 2 Avenue Hubert Curien, CS53717, 31037 Toulouse cedex 1 (France)

Tel. (33) 5 61 77 96 77
Fax. (33) 5 61 77 76 41
E-mail: leonardo.astudillo31@gmail.com or thierry.levade@inserm.fr

**Running title:** How Parkinson disease can benefit from Gaucher disease

**Abstract**

Parkinson disease is the second most common neurodegenerative condition after Alzheimer's disease. The underlying mechanisms in PD are multiple and complex. Gaucher disease (GD) is a rare disorder of the lysosome, resulting from defective activity of ß-glucocerebrosidase. Multiple reports have described the clinical association of parkinsonism and type 1 GD, and then multiples studies have confirmed the strong association between GBA1 mutations and PD. We review basic science that has disclosed the relationship between the enzyme implicated in GD and a key protein in PD, α-synuclein. This review focuses on how a rare genetic condition can contribute to a better understanding of frequent disorders such as synucleinopathies, and how it could foster new therapeutic targets

## Introduction

The last two decades have witnessed significant developments in our understanding of the pathogenesis of Parkinson disease (PD), a frequent neurodegenerative disorder. The discovery of a clinical link between a rare lysosomal disorder, Gaucher disease (GD), and PD has tremendously contributed to such trends. Investigations at the molecular level have disclosed a close relationship between the enzyme implicated in GC and a key protein in PD, α-synuclein. This paper focuses on how a rare genetic condition (such as GD) can contribute to a better understanding of frequent disorders such as synucleinopathies, and how it could foster new therapeutic targets.

## Parkinson's disease

PD is the second most common neurodegenerative condition after Alzheimer's disease. Its prevalence is ~0.3% in the population as a whole, and increases to about 1% for individuals aged 60 years or over. PD is characterized by resting tremor, akinesia, rigidity, and postural instability, caused by selective degeneration of dopaminergic neurons within substantia nigra pars compacta, and subsequent depletion of dopamine in their striatal projections [1]. Replacement of brain dopamine by L-dopa is an effective symptomatic treatment, but has no effect on the degenerative process. PD therefore remains incurable. Most cases of PD are sporadic with family cases being rare. The underlying mechanisms in PD are multiple and complex. Degeneration of the dopaminergic cells within the substantia nigra is related to cell death caused by α-synuclein aggregation, a dysfunction of the proteosomal and lysosomal systems, as well as reduced mitochondrial activity. Moreover, excitotoxicity and inflammation are likely to be involved in progressive neuronal degeneration. Attempts to

clarify PD pathogenesis mechanisms have lead to intensive research aiming to promote novel therapeutic strategies.

Data from twin and family studies, the mapping and cloning of *PARK* genes, and analysis of potential susceptibility genes have provided increasing evidence of a causative role of genetic factors in PD. Earlier genetic studies have shown that six genes, i.e., Leucine-rich repeat kinase 2 (*LRRK-2*), Parkin (*PARK2*), α-synuclein (*SNCA*) and, more rarely, *DJ1*, *PINK1*, and *ATP13A2*, are linked to L-dopa-responsive parkinsonism. There is also evidence indicating that environmental factors are critical in the causation of PD.

**Gaucher disease**

GD is the most frequent lysosomal disorder ([OMIM] #606463). This inborn error is a lipid storage disorder, with autosomal recessive inheritance, resulting from defective activity of ß-glucocerebrosidase (or acid beta-glucosidase, GCase, EC.3.2.1.45). GCase is encoded by *GBA1* that maps to chromosome 1q21-22 [2]. Mature GCase is a glycoprotein with 497 amino acid residues. Its hydrolytic activity cleaves the ß-glucosyl linkage of glucosylceramide (GlcCer). Over 300 *GBA1* mutations have been identified. The resulting decrease in GCase activity leads to the accumulation of GlcCer and other substrates. The visceral manifestations of GD are characterized by accumulation of GlcCer in cells of the reticulo-endothelial system of the liver, spleen and bone marrow. Current clinical nosology provides classification into three phenotypes: 1) type 1 is the most common variant in the western world with onset from childhood to adulthood [3]. Primary, early onset neuronopathic disease is absent in this variant, but visceromegaly, cytopenias and bone involvement are the major signs. Types 2 and 3 GD are neuronopathic diseases with varying degrees of onset and progression. These variants represent a continuum of neuronopathic involvement Diagnosis is established by diminished activity of GCase, with confirmation by the identification of *GBA1* mutations. Enzyme replacement therapy with recombinant enzymes (imiglucerase, velaglucerase or taliglucerase) has become the standard of care.

**Parkinson and Gaucher's diseases: from bed to bench**

Since the nineties, multiple reports have described the clinical association of parkinsonism and type 1 GD, initially as case reports and then in larger series of patients [4]. Those patients presented an atypical parkinsonism with onset at a younger age (41-55) and resistance to conventional PD therapies [5-8]. Higher prevalences of PD were present in first-degree relatives of GD patients. In 2004, studies of nonaffected relatives of GD patients indicated that homozygosity and also heterozygosity for *GBA1* mutations were risk factors for the

development of parkinsonism [9]. The same year, genetic studies of 99 Ashkenazi Jewish PD patients from Israel, found that 31.3% of PD patients carried at least one pathogenic *GBA1* mutation vs. 6.2% in the control group of 1543 Ashkenazi Jewish individuals ($p<0.0001$) [10]. An international multicenter of 5691 patients with PD (including 780 Ashkenazi Jews) and 4898 controls (387 Ashkenazi Jews), [11] showed that among the Ashkenazi Jewish subjects, the L444P or N370S *GBA1* mutation was reported for 15% of the patients vs. 3% of controls. Among non–Ashkenazi Jewish subjects, either *GBA 1* mutation was found in 3% of patients vs.<1% of controls. The odds ratio of 5.43 for any *GBA1* mutation in PD patients revealed a strong association between *GBA1* mutations and PD. These results were confirmed in multiple ethnic cohorts worldwide [12]. Currently, *GBA1* mutations represent the greatest genetic risk factor for PD. Additionally, an international multicenter study showed a significant association between *GBA1* mutation heterozygosity and dementia with Lewy bodies (DLB) [odds ratio of 8.28 (95% CI, 4.78-14.88)] [13]. The odds ratio for PD with dementia was 6.48 (95% CI, 2.53-15.37). In DLB, *GBA1* mutations have also been found in 3.5 to 23% of brain samples [14]. GCase activity in cerebrospinal fluid had decreased in DLB patients as well as in PD [15].

Similar to brainstem-type Lewy bodies found in PD, numerous α-synuclein-positive inclusions are present in brains from patients with GD-associated. Lewy bodies are a pathological hallmark of PD [16], which contain round eosinophilic inclusions in neuronal perikarya, result from abnormal processing and accumulation of α-synuclein [17]. Lewy body inclusions are also observed in grafted neurons in patients with PD [18]. α-Synuclein is a small presynaptic protein of 14 kDa with poorly understood biologic function[20], which is present in both soluble and membrane-associated brain fractions. α-Synuclein is predominantly degraded by lysosomes, in part by chaperone mediated autophagy [19, 20]. The abnormal accumulation of insoluble α-synuclein aggregates in neurons or glial cells defines the α-synucleinopathies, including PD, DLB and multiple system atrophy (MSA) [21]. α-Synuclein mutations (A30P, E46K, H50Q, G51D and A53T) and gene duplications or triplications are also strongly associated with PD [22, 23].

Multiple studies have highlighted the central role of α-synuclein in the pathogenesis of PD [24]. Aggregated insoluble α-synuclein in the form of amyloid-like fibrils and/or soluble oligomeric intermediates are responsible for the toxicity and then degeneration of dopaminergic neurons [25-27]. α-Synuclein aggregates can undergo a neuron-to-neuron transmission, after release in the extracellular environment by exosomes and via endocytosis [28-30]. α-Synuclein species contained in Lewy bodies extracts from PD brains are pathogenic and are able to trigger α-synuclein pathology and progressive axon-initiated dopaminergic

nigrostriatal neurodegeneration in rodents and non-human primates [31]. The lysosomal degradation pathway of cells can clear preformed α-synuclein aggregates; however, its impairment can result in the accumulation of aggregates in neuronal and non-neuronal cells [27].

All these data point to a pathophysiological link between GCase and α-synuclein metabolism. Recent studies have shown that reduction of GCase activity increases α-synuclein levels in neuronal cultures and GD mouse models. Indeed, neuronal cell lines stably overexpressing various human *GBA1* mutants (N370S, L444P, D409V, D409H, E235A and E340A) display an increase in α-synuclein levels, which is dependent on the amount of expressed mutant GCase, but not on its enzyme activity [32]. In addition, the GD mouse model that is homozygous for the D409V/D409V substitution shows an age-dependent rise of α-synuclein in frontal cortices by age 12 months [32]. Moreover, heterozygosity for the L444P GBA1 mutation in a transgenic mouse model of PD (with mutated A53T α-synuclein) resulted in reduced GCase activity, reduced α-synuclein degradation, and exacerbated motor and gastrointestinal deficits [33]. Pharmacological inhibition of GCase activity by conduritol-B-epoxide (CBE) increases α-synuclein levels in a human neuroblastoma cell line with no change in α-synuclein mRNA [34]. CBE-treated mice also show elevated α-synuclein levels in nigral neurons and astroglia, and abnormal dopamine transmission [35]. In another *in vitro* model, α-synuclein levels did not change after CBE treatment in differentiated and non-differentiated neuronal cells [36]. Inhibition of GCase by CBE is also able to induce abnormalities in mitochondrial function and oxidative stress in human dopaminergic cells [37].

In 2010, immunofluorescence and confocal microscopy studies on brain samples disclosed the presence of GCase in Lewy bodies and Lewy neuritis in patients with at least one *GBA1* mutation [38]. GCase colocalised with α-synuclein, but also with the lysosomal membrane protein LAMP-1. A year later, nuclear magnetic resonance spectroscopy showed that, at acidic pH GCase interacts directly with the C-terminus of α-synuclein [39]. Surprisingly, the N370S mutant form of GCase, as well as the CBE-bound enzyme, showed a reduced affinity for α-synuclein. Membrane-bound α-synuclein interacts with GCase in a complex that inhibits enzyme function [40]. Mazzulli *et al.* provided further insights into the interaction mechanisms between α-synuclein and GCase [41]. In cultured primary neurons, silencing of GCase by short hairpin RNAs was accompanied by a 50% reduction of GCase activity and a 4-fold increase of GlcCer, α-synuclein, but not tau protein concentrations increased by 1.8-times. C'est vrai, cette fin de phrase est à éclaircir. The unchanged mRNA levels of α-synuclein suggest that the increase in α-synuclein results from a decreased lysosomal degradation capacity [41]. Moreover,

dopaminergic neurons generated from induced pluripotent stem (iPS) cells derived from GD fibroblasts also exhibit an important increase in α-synuclein levels and a reduced proteolysis of long-lived proteins. These observations also indicate that neurotoxicity appears to depend on amino acids 71–82 of α-synuclein, a region required for its polymerization. Meanwhile, GlcCer accumulation also affects the aggregation of α-synuclein in vitro by stabilizing soluble oligomeric intermediates. Most importantly, GCase depletion can promote the formation of soluble oligomeric and insoluble α-synuclein in vivo, both in mouse models (4L/PS-NA and D409H/D409H mice) and in *Caenorhabditis elegans* [41]. Finally, human brain analyses show that soluble oligomeric α-synuclein is elevated in GD patients with PD, in the neuronopathic form of GD and in patients with DLB, who are homozygous or heterozygous for GCase mutations.

α-Synuclein has been shown to inhibit vesicle transport between the endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi apparatus. Overexpression of α-synuclein inhibits the intracellular trafficking of GCase, resulting in decreased lysosomal GCase activity. This led Mazzulli *et al.* to propose a pathogenic loop starting from the lysosome [41]. Lysosomal GlcCer accumulation due to GCase deficiency accelerates the formation and stabilizes soluble α-synuclein oligomers, eventually converted into amyloid fibrils. Accumulation of α-synuclein impairs the ER-Golgi trafficking of GCase, responsible for a reduced amount of GCase in the lysosome which in turn amplifies GlcCer accumulation and stabilization of α-synuclein oligomers [41].

However, the absence of oligomeric α-synuclein in samples from type 1 GD without parkinsonism indicates that factors other then GCase deficiency may contribute to oligomerization of α-synuclein in neuronopathic GD. α-Synuclein can interact with GCase in a complex that inhibits enzyme activity in a dose-dependent manner [40, 42]. Analyses of PD patient brains with or without heterozygote *GBA1* mutations have provided evidence that lower GCase activity (particularly in the substantia nigra) is associated with decreased GCase protein levels, but unchanged *GBA1* mRNA levels or lysosomal content [42]. The unfolded protein response/ER-associated degradation pathway was activated and may play a role in reduced GCase protein levels [42]. More recently, GCase activity was found to be lower in brain tissue from patients with sporadic PD without *GBA1* mutations [43]. GCase protein and activity levels were selectively reduced in brain regions affected by α-synuclein deposition in early stages of PD compared to brain regions lacking α-synuclein. In plasma of GD patients, oligomeric α-synuclein form is increased, as compared to controls, but not increased in GD patients receiving enzyme replacement therapy [44].

**Can GCase be used to treat Parkinson disease?**

Of major interest are some observations that suggest the ability for GCase to provide some protection against parkinsonism. The mouse model of GD that is homozygous for the D409V/D409V substitution exhibits an accumulation of α-synuclein aggregates in hippocampal neurons and a memory deficit, related to the loss of GCase activity and a possible toxicity resulting from a gain-of-function of the mutant enzyme [45]. Functional restoration of GCase activity in the central nervous system of early and late symptomatic D409V/D409V mice by recombinant self-complementary adeno-associated viral vectors expressing human GCase improves histopathological lesions and memory deficit, and reduces α-synuclein aggregates and glucosylsphingosine. Moreover, overexpression of *GBA1* in the central nervous system of transgenic A53T α-synuclein mice, which accumulate α-synuclein aggregates in brain and display lower brain GCase activities than wild-type animals, is able to reduce the soluble α-synuclein level [46]. In the same way, manipulating the GCase pathway by the use of chaperone molecules, such as ambroxol or iminosugar derivatives to treat PD represents a potential therapeutic strategy. Indeed, ambroxol was reported to improve lysosomal biochemistry and oxidative stress in cells harboring *GBA1* mutations, and to reduce α-synuclein in an overexpressing neuroblastoma line [47]. These findings thus indicate that correction of the GCase defect may provide some protection against PD.

Moreover, manipulating LIMP-2, the protein that targets GCase to the lysosomes of many cell types, might also represent a therapeutic approach to treat PD. Indeed, LIMP-2–deficient mice exhibit severe neurological impairments (tremor and progressive partial paralysis), related to α-synuclein accumulation, mediating toxicity of dopaminergic neurons, apoptosis and inflammation. The brains of LIMP-2–deficient mice show reduced GCase activity, lipid storage, and lysosomal/autophagic dysfunction. Interestingly, overexpression of LIMP-2 is increased clearance of α-synuclein [48].

Nevertheless, how the GCase-α-synuclein link positions in the complex pathogenesis of PD that involves impairment of autophagy-lysosomal pathways, ubiquitin proteasomal system mitochondrial dysfunction, and oxidative stress, still requires further investigation. Alterations in these pathways also underlie the pathogenesis of several lysosomal disorders. For instance, patients who carry certain mutations in the *SMPD1* gene, mutated in Niemann-Pick disease, another lysosomal sphingolipid storage disorder, have a higher risk of developing PD [49, 50].

To conclude, the recent discovery of an intricate connection between *GBA1* and α-synuclein has not only shed light on unexpected mechanisms in PD, but also provided new opportunities for potential synucleopathies therapy. It also shows that better knowledge of orphan disorders may contribute to a better understanding of more common diseases.

**References**

1. Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease. Lancet 2009;373(9680):2055-66.
2. Grabowski GA, Gatt S, Horowitz M. Acid beta-glucosidase: enzymology and molecular biology of Gaucher disease. Crit Rev Biochem Mol Biol 1990;25(6):385-414.
3. Grabowski GA. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. Lancet 2008;372(9645):1263-71.
4. Neudorfer O, Giladi N, Elstein D, et al. Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. QJM 1996;89(9):691-4.
5. Machaczka M, Rucinska M, Skotnicki AB, Jurczak W. Parkinson's syndrome preceding clinical manifestation of Gaucher's disease. Am J Hematol 1999;61(3):216-7.
6. Tayebi N, Callahan M, Madike V, et al. Gaucher disease and parkinsonism: a phenotypic and genotypic characterization. Mol Genet Metab 2001;73(4):313-21.
7. Varkonyi J, Rosenbaum H, Baumann N, et al. Gaucher disease associated with parkinsonism: four further case reports. Am J Med Genet A 2003;116A(4):348-51.
8. Bembi B, Zambito Marsala S, Sidransky E, et al. Gaucher's disease with Parkinson's disease: clinical and pathological aspects. Neurology 2003;61(1):99-101.
9. Goker-Alpan O, Schiffmann R, LaMarca ME, Nussbaum RL, McInerney-Leo A, Sidransky E. Parkinsonism among Gaucher disease carriers. J Med Genet 2004;41(12):937-40.
10. Aharon-Peretz J, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R. Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. N Engl J Med 2004;351(19):1972-7.
11. Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. N Engl J Med 2009;361(17):1651-61.
12. Mao X, Wang T, Peng R, et al. Mutations in GBA and risk of Parkinson's disease: a meta-analysis based on 25 case-control studies. Neurol Res 2013;35(8):873-8.
13. Nalls MA, Duran R, Lopez G, et al. A multicenter study of glucocerebrosidase mutations in dementia with Lewy bodies. JAMA Neurol 2013;70(6):727-35.
14. Mata IF, Samii A, Schneer SH, et al. Glucocerebrosidase gene mutations: a risk factor for Lewy body disorders. Arch Neurol 2008;65(3):379-82.
15. Balducci C, Pierguidi L, Persichetti E, et al. Lysosomal hydrolases in cerebrospinal fluid from subjects with Parkinson's disease. Mov Disord 2007;22(10):1481-4.
16. Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K, Braak H. 100 years of Lewy pathology. Nat Rev Neurol 2013;9(1):13-24.
17. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. Nature 1997;388(6645):839-40.
18. Li JY, Englund E, Holton JL, et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. Nat Med 2008;14(5):501-3.
19. Mak SK, McCormack AL, Manning-Bog AB, Cuervo AM, Di Monte DA. Lysosomal degradation of alpha-synuclein in vivo. J Biol Chem 2010;285(18):13621-9.
20. Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. Science 2004;305(5688):1292-5.
21. McCann H, Stevens CH, Cartwright H, Halliday GM. alpha-Synucleinopathy phenotypes. Parkinsonism Relat Disord 2014;20 Suppl 1:S62-7.
22. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science 1997;276(5321):2045-7.
23. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. Science 2003;302(5646):841.

24. Dehay B, Martinez-Vicente M, Caldwell GA, et al. Lysosomal impairment in Parkinson's disease. Mov Disord 2013;28(6):725-32.
25. Winner B, Jappelli R, Maji SK, et al. In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108(10):4194-9.
26. Cremades N, Cohen SI, Deas E, et al. Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of alpha-synuclein. Cell 2012;149(5):1048-59.
27. Lee HJ, Khoshaghideh F, Patel S, Lee SJ. Clearance of alpha-synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway. J Neurosci 2004;24(8):1888-96.
28. Desplats P, Lee HJ, Bae EJ, et al. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106(31):13010-5.
29. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Schapira AH, et al. Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. Neurobiol Dis 2011;42(3):360-7.
30. Hansen C, Angot E, Bergstrom AL, et al. alpha-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. J Clin Invest 2011;121(2):715-25.
31. Recasens A, Dehay B, Bove J, et al. Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. Ann Neurol 2014;75(3):351-62.
32. Cullen V, Sardi SP, Ng J, et al. Acid beta-glucosidase mutants linked to Gaucher disease, Parkinson disease, and Lewy body dementia alter alpha-synuclein processing. Ann Neurol 2011;69(6):940-53.
33. Fishbein I, Kuo YM, Giasson BI, Nussbaum RL. Augmentation of phenotype in a transgenic Parkinson mouse heterozygous for a Gaucher mutation. Brain 2014;137(Pt 12):3235-47.
34. Manning-Bog AB, Schule B, Langston JW. Alpha-synuclein-glucocerebrosidase interactions in pharmacological Gaucher models: a biological link between Gaucher disease and parkinsonism. Neurotoxicology 2009;30(6):1127-32.
35. Ginns EI, Mak SK, Ko N, et al. Neuroinflammation and alpha-synuclein accumulation in response to glucocerebrosidase deficiency are accompanied by synaptic dysfunction. Mol Genet Metab 2014;111(2):152-62.
36. Dermentzaki G, Dimitriou E, Xilouri M, Michelakakis H, Stefanis L. Loss of beta-glucocerebrosidase activity does not affect alpha-synuclein levels or lysosomal function in neuronal cells. PLoS One 2013;8(4):e60674.
37. Cleeter MW, Chau KY, Gluck C, et al. Glucocerebrosidase inhibition causes mitochondrial dysfunction and free radical damage. Neurochem Int 2013;62(1):1-7.
38. Goker-Alpan O, Stubblefield BK, Giasson BI, Sidransky E. Glucocerebrosidase is present in alpha-synuclein inclusions in Lewy body disorders. Acta Neuropathol 2010;120(5):641-9.
39. Yap TL, Gruschus JM, Velayati A, et al. Alpha-synuclein interacts with Glucocerebrosidase providing a molecular link between Parkinson and Gaucher diseases. J Biol Chem 2011;286(32):28080-8.
40. Yap TL, Velayati A, Sidransky E, Lee JC. Membrane-bound alpha-synuclein interacts with glucocerebrosidase and inhibits enzyme activity. Mol Genet Metab 2013;108(1):56-64.
41. Mazzulli JR, Xu YH, Sun Y, et al. Gaucher disease glucocerebrosidase and alpha-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. Cell 2011;146(1):37-52.
42. Gegg ME, Burke D, Heales SJ, et al. Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. Ann Neurol 2012;72(3):455-63.
43. Murphy KE, Gysbers AM, Abbott SK, et al. Reduced glucocerebrosidase is associated with increased alpha-synuclein in sporadic Parkinson's disease. Brain 2014;137(Pt 3):834-48.

44. Pchelina SN, Nuzhnyi EP, Emelyanov AK, et al. Increased plasma oligomeric alpha-synuclein in patients with lysosomal storage diseases. Neurosci Lett 2014;583:188-93.
45. Sardi SP, Clarke J, Kinnecom C, et al. CNS expression of glucocerebrosidase corrects alpha-synuclein pathology and memory in a mouse model of Gaucher-related synucleinopathy. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108(29):12101-6.
46. Sardi SP, Clarke J, Viel C, et al. Augmenting CNS glucocerebrosidase activity as a therapeutic strategy for parkinsonism and other Gaucher-related synucleinopathies. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110(9):3537-42.
47. McNeill A, Magalhaes J, Shen C, et al. Ambroxol improves lysosomal biochemistry in glucocerebrosidase mutation-linked Parkinson disease cells. Brain 2014;137(Pt 5):1481-95.
48. Rothaug M, Zunke F, Mazzulli JR, et al. LIMP-2 expression is critical for beta-glucocerebrosidase activity and alpha-synuclein clearance. Proc Natl Acad Sci U S A 2014;111(43):15573-8.
49. Gan-Or Z, Ozelius LJ, Bar-Shira A, et al. The p.L302P mutation in the lysosomal enzyme gene SMPD1 is a risk factor for Parkinson disease. Neurology 2013;80(17):1606-10.
50. Foo JN, Liany H, Bei JX, et al. Rare lysosomal enzyme gene SMPD1 variant (p.R591C) associates with Parkinson's disease. Neurobiol Aging 2013;34(12):2890 e13-5.