



HAL
open science

Etude du rôle de la glucosylcéramidase dans le mélanome cutané

Patricia Dubot

► **To cite this version:**

Patricia Dubot. Etude du rôle de la glucosylcéramidase dans le mélanome cutané. Cancer. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2021. Français. NNT : 2021TOU30197 . tel-03663094

HAL Id: tel-03663094

<https://theses.hal.science/tel-03663094>

Submitted on 9 May 2022

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Patricia DUBOT

Le 14 décembre 2021

Etude du rôle de la glucosylcéramidase dans le mélanome cutané

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

Spécialité : **CANCEROLOGIE**

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

Thèse dirigée par
Nathalie ANDRIEU-ABADIE et Frédérique SABOURDY

Jury

M. Francois MAILLOT, Rapporteur
Mme Catherine CAILLAUD, Rapporteur
M. Jérôme AUSSEIL, Examineur
Mme Nathalie ANDRIEU-ABADIE, Directrice de thèse



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Patricia DUBOT

Le 14 décembre 2021

Etude du rôle de la glucosylcéramidase dans le mélanome cutané

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

Spécialité : **CANCEROLOGIE**

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

Thèse dirigée par
Nathalie ANDRIEU-ABADIE et Frédérique SABOURDY

Jury

M. Francois MAILLOT, Rapporteur
Mme Catherine CAILLAUD, Rapporteuse
M. Jérôme AUSSEIL, Examineur
Mme Nathalie ANDRIEU-ABADIE, Directrice de thèse

Remerciements

Je voudrais remercier tout d'abord le **Pr François Maillot** et le **Dr Catherine Caillaud**. J'ai déjà eu l'opportunité de vous écouter en réunion pluridisciplinaire ou de vous côtoyer en congrès (SFEIM, ESGLD) et j'ai été très agréablement surprise par votre enthousiasme et rapidité avec laquelle vous avez accepté d'évaluer mon travail. J'espère que mon travail vous intéressera autant qu'il m'a passionné.

Je remercie le **Pr Jérôme Ausseil** d'avoir accepté d'être le président du jury et d'examiner mon travail. Cela fait seulement quelque mois que nous nous côtoyons réellement et cela a été très motivant pour moi, tu m'as déjà sortie de ma zone de confort ! J'espère que mon travail t'intéressera et qu'une future collaboration sera possible.

Je remercie évidemment mes directrices de thèse les **Drs Frédérique Sabourdy** et **Nathalie Andrieu-Abadie** d'avoir eu la folie de m'encadrer. Je vous remercie de m'avoir laissé de l'autonomie et de m'avoir fait entrevoir le métier de chercheur dans un contexte hospitalo-universitaire. Merci d'avoir été là dans ces derniers mois de corrections intenses qui ont demandé beaucoup d'investissement.

Je remercie bien évidemment le **Pr T. L.** qui est à l'origine de tout cela mais qui a voulu garder l'anonymat dans ce travail (et oui, jusque dans mon manuscrit je vous taquinerai). J'espère garder en mémoire toute la science des lipides que vous m'avez transmise mais je ne retiendrai pas vos conseils assez surprenants pour les moments difficiles.

Mon manuscrit étant déjà bien assez long dû à mon goût trop prononcé pour la biblio (sorry !), je ne m'épancherai pas longuement sur les remerciements.

Je remercie du fond du cœur les personnes qui ont contribué directement ou indirectement (c'est-à-dire remontage de moral) à l'aboutissement de ce travail dont je suis fière. Pour moi, ces personnes sont comme un constellation d'étoiles qui m'a guidé avec bienveillance. Je pense notamment à mon

bicéphale Madame Lorry Morela qui, sans elle, ma thèse n'aurait pas eu la même saveur, à Cynthia (mon autre moi), à ma Joe (ma sœur de cœur qui malgré les distances est toujours là), à Mélanie (mon guide dans cette vie), à Laurence Pellerin (le buster moon de Stanford qui face à mon MD à préférer partir), à Fred (avec qui j'ai beaucoup appris et grandi professionnellement et personnellement), à Thierry (avec qui j'ai appris énormément et que j'ai pris plaisir à taquiner), à Virginie (pour avoir ri avec ferveur à mes blagues), à ma P et C (qui m'accompagnent à chaque instant) et forcément à James, my Irishman du Connemara qui a la folie de partager ma vie depuis déjà 8 ans.

Enfin, je remercie toute l'équipe 4 du CRCT : Nathalie, Bruno, Céline, Joëlle, Elodie, Stéphane, Laura, Carine, Mathieu, Matthieu, Anne, Stéphanie, Alexandre, Patricia, Laurence N, et Lisa.

Un merci spécial pour Sandra et Rémi de l'équipe 3 et Manon de la plateforme techno qui m'ont beaucoup aidé ces derniers mois ainsi que Magali Pettazzoni pour avoir analysé mes échantillons.

Bien que cette thèse représente le côté universitaire de mon travail, je reste un médecin biologiste et je ne peux pas ne pas remercier l'ensemble technique (PTA et PTS), biologique (service de biochimie Purpan-Rangueil) et clinique (les pédiatres de l'Hôpital des Enfants) du CHU de Toulouse qui ont rendu parfois mon quotidien schizophrénique mais qui nous rappelle pourquoi on fait ce travail.

Une page bien remplie se termine, une autre s'ouvre (and I hope on scenic and rainy landscapes).

Nous ne sommes en rien des objets soumis à quelque destin, mais des passagers conscients et mortels agissant sur cette planète.

Nous sommes des dépositaires et passeurs d'expériences, de savoirs échangeant en projection leurs questionnements, leurs ambitions, leurs idées, rêves, idéaux, leurs luttes et combats, pour avancer en résonances, par nos unicités partagées.

Albert Jacquard

Résumé

Le mélanome cutané (MC) est le cancer le plus sévère des cancers de la peau dont l'incidence ne cesse d'augmenter. Malgré des avancées majeures dans la prise en charge du MC avec le développement des thérapies ciblées et de l'immunothérapie, le pronostic des patients atteint de MC reste mauvais. Dans le mélanome cutané, des altérations du métabolisme des sphingolipides, une classe de lipide particulier, ont été montrées par notre équipe et d'autres. Ces altérations pourraient avoir un rôle dans la survenue, la progression et la résistance aux thérapies et s'articulent essentiellement autour d'une diminution de la production du céramide, considéré comme un anti-oncométabolite, et en faveur d'une augmentation de sphingosine-1-phosphate, considéré comme un oncométabolite. La glucosylcéramidase, codée par le gène *GBA*, est une enzyme lysosomale qui catalyse la dernière étape du catabolisme des sphingolipides transformant le glucosylcéramide (GlcCer) en céramide. L'analyse d'un exome de patients atteints de MC a révélé des mutations faux-sens dans le gène *GBA*. Le déficit en GCase est connu pour être responsable de la maladie de Gaucher, une maladie de surcharge lysosomale dans laquelle les patients présentent une organomégalie avec ou sans troubles neurologiques. L'origine de ces symptômes serait l'accumulation du GlcCer qui n'est plus dégradé, ainsi que sa forme déacylée, la glucosylsphingosine (GlcSph). De plus, ces patients ont un risque accru de développer des cancers et notamment le mélanome cutané. Le rôle de ces métabolites dans le développement des cancers est évoqué. Parallèlement, les mutations de *GBA*, à l'état homozygotes mais aussi hétérozygotes, sont un facteur de risque de développer la maladie de Parkinson, une maladie neurodégénérative dans laquelle des agrégats d'alpha-synucléine sont retrouvés dans les neurones. Le déficit en GCase, *via* l'accumulation en GlcCer et GlcSph, favoriserait l'agrégation d'alpha-synucléine. De façon intéressante, les patients atteints de la maladie de Parkinson présente un risque augmenté de développer un mélanome cutané. Les agrégats d'alpha-synucléine, secondaire au déficit en GCase, pourrait jouer un rôle dans la mélanomagenèse.

Les mécanismes qui sous-tendent le lien entre la maladie de Gaucher et le mélanome cutané reste inconnus. Notre projet est de déterminer le rôle de la GCase dans le développement du mélanome cutané. Pour cela, des lignées cellulaires de mélanome humain (A375) ont été utilisées, dans lesquelles l'expression et/ou l'activité de la GCase ont été inhibées par ARN interférence (sh dirigé contre *GBA*) ou par inhibition pharmacologique (Conduritol B Epoxide) et dans lesquelles la surexpression de la GCase sauvage et mutée a été réalisée par transduction lentivectorale. Ces lignées ont également été traitées par la GlcSph pour l'étude de son implication dans la tumorigenèse. Les propriétés tumorales ont été étudiées comme la prolifération, le cycle cellulaire et la réponse aux thérapies ciblées, ainsi qu'une analyse des sphingolipides. L'expression de l'alpha-synucléine a également été analysée dans ces différents modèles cellulaires.

Nous avons montré que l'inhibition de l'expression/activité de la GCase n'a pas modifié les propriétés tumorales comme la prolifération cellulaire et la sensibilité aux thérapies ciblées. Cependant, le traitement des cellules de mélanome avec la GlcSph montre une diminution transitoire et réversible de la prolifération et la production de cellules multinucléées dont la fonction reste inconnue. Quant à l'expression de l'alpha-synucléine, nos premiers résultats ne sont pas concluant en raison de difficultés techniques.

Nos résultats bien que préliminaires montrent un effet de la GlcSph sur la prolifération ainsi que sur le cycle cellulaire, qui pourraient jouer un rôle dans la progression tumorale et nous donne des indications quant au métabolisme de la GlcSph.

Abstract

Cutaneous melanoma (CM) is the most severe skin cancer whom the incidence is keeping growing. Despite of the remarkable improvement of CM management thanks to the development of targeted therapies and immune checkpoint inhibitors, the prognostic of CM patients remains still bad. Some alterations in sphingolipid (SL) metabolism have been described in CM by our research team and others. These alterations could be involved in the tumoral development and the drug resistance, and hinge on a decrease of ceramide production, considered as an anti-oncometabolite and on an increase of sphingosine-1-phosphate production, considered as an oncometabolite. Glucosylceramidase (GCCase), encoded by *GBA* gene, is a lysosomal enzyme, which hydrolyze glucosylceramide (GlcCer) into ceramide, the last step of SL catabolism. The analysis of exome from MC patients has revealed missense mutations in *GBA* gene. GCCase deficiency results in Gaucher disease (GD), a lysosomal storage disease, in which patients display an organomegaly with or without a neurological involvement. The clinical presentation would result from the accumulation of undegraded GlcCer and of GlcSph corresponding with its deacylated form. Moreover, the patient with GD have an increase of risk for developing a cancer, including CM. The involvement of these lipids is evoked. On the other hand, mutations in *GBA* gene at homozygous or heterozygous state are a risk factor for developing Parkinson disease (PD), a neurodegenerative disorder, in which, alpha-synuclein aggregates are found in neurons. The accumulation of GlcCer and GlcSph, due to GCCase deficiency, would promote alpha-synuclein aggregation. Interestingly, patients with PD have also a greater risk for developing CM. Thus, alpha-synuclein aggregates, secondary to GCCase deficiency, could be involved in CM development.

Mechanisms underlying between GD and CM remains elusive. Here, our aim is to determine the role of GCCase in CM development. For that, human melanoma cell lines (A375) have been used, in which the expression and the catalytic activity of GCCase have been reduced by either RNA silencing (shRNA against *GBA*) or by pharmacological inhibition (Conduritol B Epoxide), and A375 cell lines in which GCCase wild type and mutated have been overexpressed by lentiviral transduction. In addition, A375 cell line have been treated by GlcSph in order to study its involvement in cancer development. Cancer cell properties such as cell proliferation, cell cycle and response to drugs have been tested as well as a SL analysis. Alpha-synuclein expression has been also assessed in these different cellular models.

We have shown that the inhibition of expression and/or activity of GCCase do not modify cancer cell properties. However, cells treated by GlcSph exhibit a temporary and reversible decrease of cell growth and some of them have become giant multinucleated cells but their function is unknown. As for assessment of alpha-synuclein expression, technical problems have us hampered to conclude.

Our preliminary results show a potential effect of GlcSph on development of CM and some indications about GlcSph metabolism.

Abréviations

7-AAD: 7-aminoactinomycin D	GpNMB : glycoprotein nonmetastatic melanoma protein b
AAV: adéno-associated virus	GSL : glycosphingolipides
ACDase: céramidase acide	HAS : haute autorité de santé
AKT: protéine kinase B	HDACi : inhibiteurs des acétylases des histones
ATF6: activating transcription factor 6	Ig: immunoglobuline
ATU : autorisation temporaire d'utilisation	IP: iodure de propidium
BCL-2: B-cell lymphoma-2	iPSC: induced pluripotent stem cells
BIP: Binding Immunoglobulin Protein	IRE1: inositol-requiring enzyme 1
BRAFi : inhibiteurs sélectifs de BRAF muté	LAMP: Lysosome-Associated Membrane Proteins
CBE: conduritol B epoxide	LC-MS: Liquid chromatography–mass spectrometry
CCL18: C-C Motif Chemokine Ligand 18	LCR : liquide céphalorachidien
Cer: céramide	LIMP2: Lysosomal Integral Membrane Protein 2
CETG: comité d'évaluation des traitements de la maladie de Gaucher	LRO: lysosome-related organelles
CHO: Chinese hamster ovary	MAPK: mitogen-activated protein kinase
Chol: cholestérol	MC1R: Melanocortin 1 receptor
CHOP: C/EBP homologous protein	MCF7: Michigan Cancer Foundation-7
CLEAR: coordinated lysosomal expression and regulation	MDR1: multidrug resistance protein 1
cREB cAMP- Responsive Element Binding protein	MDSC: myeloid-derived suppressor cells
CTLA4: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	MEKi: inhibiteurs de MEK
DCT: DOPAchrome tautomérase	MGUS: Monoclonal gammopathy of undetermined significance
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium	MITF: Microphthalmia-associated Transcription Factor
DMSO: Dimethyl sulfoxide	mTOR: mammalian target of rapamycin
eIF2 α : eukaryotic translation initiation factor 2, subunit α	MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
ERT : Enzymothérapie substitutive	PAR-2: protease-activated receptor-2
EtOH: éthanol	PBMC: peripheral blood mononuclear cell
GalCer: galactocéramide	PBS: phosphate buffer sa
GalSph: galactosphingosine	PD1: programmed cell death-1
GCase: glucosylcéramidase	PERK: protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase
GCS: glucosylcéramide synthase	PGCC: polyploidy giant cancer cells
GlcCer: glucosylcéramide	PI3K: Phosphoinositide 3-kinases
GlcChol : glucosylcholestérol	
GlcChol: glucosylcholestérol	
GlcSph: glucosylsphingosine	

PMEL: Premelanosome Protein
POMC: proopiomélanocortine
PPAR γ : Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma
RE: reticulum endoplasmique
RGP: radial growth phase
RIPK: receptor interacting protein kinase
ROS: espèces réactives de l'oxygène
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
S1P: sphingosine-1-phosphate
SapC: saposine C
SL: sphingolipides
SM: sphingomyéline
SNAP: Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Proteins
SNARE: SNAP REceptor
So: sphingosine

SRT : Substrate reduction therapy, réducteurs de substrats
SVF : sérum de veau foetal
TBS(T): tris-buffered saline (Tween 20)
TDAG8: T-cell death-associated gene 8
TEM: transition épithélio-mésenchymateuse
TFE3: Transcription Factor Binding To IGHM Enhancer 3
TFEB: Transcription Factor E Box
TRP: tyrosinase related protein
TSS: site d'initiation de la transcription
TYR: tyrosinase
UPR: Unfolded Protein Response
UV: ultraviolet
VGP: vertical growth phase
XBP1: X box-binding protein 1
 α -MSH : Melanocyte Stimulating Hormone

Table des matières

Remerciements.....	2
Résumé.....	6
Abstract.....	7
Abréviations.....	8
Table des matières	10
Liste des figures	13
Avant-propos	18
Revue bibliographique.....	20
I. La glucosylcéramidase : conséquences de son déficit en physiopathologie humaine.....	20
A. La glucosylcéramidase (ou GCase).....	20
1. Une enzyme lysosomale du catabolisme des glycosphingolipides	20
2. Le gène <i>GBA</i>	26
3. La GCase	28
4. Les autres GCases	30
5. Fonctions biologiques de la GCase.....	30
6. La GCase au niveau cutané	33
B. Maladie de Gaucher.....	36
1. Epidémiologie	36
2. Tableau clinique.....	36
3. Diagnostic biologique.....	38
4. Physiopathologie	41
5. Prise en charge thérapeutique	50
C. Maladie de Parkinson	54
1. Présentation clinique et thérapeutique.....	54
2. Pathogénie de la maladie de Parkinson	55
3. Lien maladie de Gaucher - maladie de Parkinson	58
D. Cancers	64
1. Lien épidémiologique	64
2. Inflammation chronique et dérégulation immunitaire	71
3. Autophagie et réponse UPR.....	73
4. Résistance aux traitements.....	74
II. Le mélanome	75
A. Epidémiologie	75
B. Le mélanocyte.....	76
1. La mélanogenèse	77
	10

2. Le facteur de transcription MITF	79
C. Initiation et progression du mélanome.....	81
1. Mutations somatiques.....	81
2. Rôle des UV.....	83
3. Changement phénotypique	84
4. Rôle de l'alpha-synucléine	85
D. Prise en charge	88
1. Mélanome localisé.....	88
2. Mélanome métastatique	88
E. Dérégulation du métabolisme des sphingolipides dans le mélanome.....	91
1. Le céramide : un anti-oncométabolite.....	93
2. Les effets associés au métabolisme du céramide dans le mélanome.....	96
Conclusion générale et objectifs de thèse	98
Matériel et méthodes (1ère partie)	99
A. Lignées cellulaires	99
B. Transfection des shARN	99
C. Animaux.....	100
D. Drogues.....	100
E. Analyse de la croissance tumorale.....	100
F. Activité enzymatique de la glucosylcéramidase.....	101
G. Western Blot.....	101
H. Analyse des sphingolipides	102
I. Etude de la prolifération cellulaire.....	103
J. Etude de la viabilité cellulaire	103
K. Etude de la mort cellulaire.....	104
L. Etude du cycle cellulaire	104
M. Immunofluorescence	105
N. Analyses statistiques.....	105
Résultats expérimentaux (1ère partie).....	106
I. Résultats antérieurs : Etude <i>in vivo</i>	106
A. La croissance du mélanome est exacerbée dans les modèles murins Gaucher Gba1 ^{D409V/null} et Gba1 ^{D409V/D409V}	106
II. Résultats de thèse : Etude <i>in vitro</i>	110
A. Expression et activité de la glucosylcéramidase dans le mélanome	110
B. Génération de modèles cellulaires d'inhibition génétique et pharmacologique de la glucosylcéramidase.....	111
C. L'inhibition de la glucosylcéramidase ne modifie pas la prolifération <i>in vitro</i> des cellules de mélanome.....	113

D.	La glucosylsphingosine diminue la croissance des cellules de mélanome <i>in vitro</i>	114
E.	La glucosylsphingosine induit la nécrose des cellules de mélanome <i>in vitro</i>	116
F.	La glucosylsphingosine génère des cellules de mélanome multinucléées.....	118
G.	La glucosylsphingosine diminue la survie des cellules de mélanome privées de sérum.....	120
H.	La glucosylsphingosine sensibilise les cellules de mélanome au dabrafénib	121
I.	Les effets induits par la glucosylsphingosine sont dépendants de sa concentration cellulaire	124
J.	Les effets anti-prolifératifs induits par la glucosylsphingosine ne sont pas dépendants de la glucosylcéramidase.....	127
	Matériel et méthodes 2 ^{ème} partie	129
A.	Cellules	129
B.	Transfection cellulaire et expression de <i>SNCA</i> sauvage ou muté	129
C.	Western Blot.....	129
	Résultats expérimentaux (2 ^{ème} partie).....	131
A.	L'inhibition de la glucosylcéramidase par le CBE ne semble pas altérer l'expression de l'alpha-synucléine dans les cellules de mélanome.....	131
B.	La glucosylsphingosine augmenterait l'expression de l'alpha-synucléine mutante dans les cellules de mélanome.	133
	Discussion.....	135
I.	Glucosylcéramidase, glucosylsphingosine et mélanome	135
A.	Relation entre expression et activité de la glucosylcéramidase et progression du mélanome	136
B.	Modèles cellulaires d'inhibition de la glucosylcéramidase	137
C.	La glucosylsphingosine diminue la croissance <i>in vitro</i> des cellules de mélanome	138
D.	La glucosylsphingosine génère des cellules de mélanome multinucléées.....	142
E.	La glucosylsphingosine sensibilise les cellules de mélanome en condition de stress	144
F.	Les effets induits par la glucosylsphingosine sont dépendants de sa concentration cellulaire	145
G.	La glucosylsphingosine ne serait pas métabolisée par la glucosylcéramidase lysosomale	146
II.	Glucosylcéramidase, glucosylsphingosine, mélanome et alpha-synucléine	147
	Conclusion	151
	Références bibliographiques	153
	Liste des publications (entre 2017 et 2021)	174

Liste des figures

Figure 1. Le lysosome et ses caractéristiques (Ballabio and Bonifacino, 2020).	21
Figure 2. Les systèmes endo-lysosomal et autophagique.....	22
Figure 3. Catabolisme des sphingolipides et pathologies associées (Schulze and Sandhoff, 2011).	23
Figure 4. Structure du céramide.....	25
Figure 5. Compartimentalisation subcellulaire du métabolisme du céramide.....	25
Figure 6. Structure du gène <i>GBA</i> et de son pseudo-gène.	26
Figure 7. Rôles de TFEB.	27
Figure 8. Régulation de TFEB.....	28
Figure 9. Structure de la GCCase.	29
Figure 10. Hydrolyse du GlcCer par la GCCase.	31
Figure 11. Action de la GCCase et de la ACDase sur leurs substrats.	31
Figure 12. Structure de certains inhibiteurs de la GCCase (Kuo et al., 2019).	32
Figure 13. GCCase et transglucosylation.	33
Figure 14. Structure de l'épiderme (<i>Servier Art Medical</i>)	34
Figure 15. Rôle de la GCCase dans l'épiderme (van Smeden et al., 2014).	35
Figure 16. Taux plasmatique (ng/ml) de CCL18 chez les patients Gaucher versus témoins (Boot et al., 2004).....	39
Figure 17. Taux plasmatique (ng/ml) de la fraction soluble de gpNMB chez les patients Gaucher type 1 versus témoins (Kramer et al., 2016).	40
Figure 18. Taux plasmatique de GlcSph (nM) et GlcCer (μ M) chez des patients Gaucher versus témoins (Dekker et al., 2011a).	40
Figure 19. Taux plasmatique de GlcSph (ng/ml) dans différentes cohortes.	41
Figure 20. Cellules de Gaucher retrouvées au myélogramme.	42
Figure 21. Formation de la GlcSph.	43
Figure 22. Rôle de l'UPR dans l'apoptose (Hetz and Papa, 2018).	47
Figure 23. Physiopathologie de la maladie de Gaucher.	49
Figure 24. Structure des molécules SRT.	52
Figure 25. Conformations physiologiques et pathologiques de l'alpha-synucléine d'après Burre et al., 2018.....	56
Figure 26. Risque relatif de porter une mutation <i>GBA</i> chez les patients parkinsoniens (Sidransky et al., 2009).....	58

Figure 27. Hypothèses physiopathologiques reliant les mutations de <i>GBA</i> au développement de la maladie de Parkinson <i>via</i> l'alpha-synucléine.	61
Figure 28. Mécanismes spécifiques et communs des maladies neurodégénératives et malignes (Seo and Park, 2020).	63
Figure 29. Taux d'incidence et de mortalité standardisés sur l'âge des cancers en 2020 dans chaque continent.	64
Figure 30. Taux d'incidence et de mortalité standardisés sur l'âge des principaux cancers en 2020... ..	75
Figure 31. Le mélanocyte.	76
Figure 32. La mélanogenèse.	78
Figure 33. La régulation de la mélanogenèse par les UV.	79
Figure 34. Les cibles de MITF.	80
Figure 35. Les différentes phases de la mélanomagenèse (Gray-Schopfer et al., 2007).	81
Figure 36. Illustration de l'activation de la voie MAPK dans le mélanome.	82
Figure 37. Schéma récapitulatif des mécanismes décrits dans ce travail au cours de la progression tumorale.	87
Figure 38. Cibles des thérapies ciblées et des immunothérapies.	88
Figure 39. Courbes de survie Kaplan-Meier au cours de différents essais cliniques (Luke et al., 2017).	91
Figure 40. Altérations du métabolisme des SL décrites dans les différentes étapes du développement du mélanome (Carrié et al., 2020).	92
Figure 41. Rôle du céramide dans le mort cellulaire des cellules cancéreuses (Ogretmen, 2018).	93
Figure 42. Rôle du céramide et de la S1P dans la sénescence (Trayssac et al., 2018).	94
Figure 43. Croissance tumorale du mélanome chez des souris <i>Gba1</i> ^{D409V/null}	107
Figure 44. Croissance tumorale des mélanomes chez les souris <i>Gba1</i> ^{D409V/D409V} et <i>Gba1</i> ^{D409V/wt}	108
Figure 45. Analyse sphingolipidomique du foie et de la rate rate chez les souris <i>Gba1</i> ^{D409V/D409V} et <i>Gba1</i> ^{D409V/wt}	109
Figure 46. Expression et activité de la GCase en fonction du stade du mélanome humain.	110
Figure 47. Génération de modèles cellulaires de mélanome humain dans lesquels la GCase a été inhibée.	112
Figure 48. Effet de l'inhibition de la GCase sur la prolifération des cellules de mélanome humain A375.	113
Figure 49. Effet de la GlcSph sur la croissance des cellules de mélanome A375 et WM35.	115
Figure 50. Effet de la GlcSph sur la viabilité et la mort cellulaire des cellules de mélanome A375.	117
Figure 51. Effet de la GlcSph sur le cycle et la morphologie des cellules de mélanome A375.	119
Figure 52. Effet de la GlcSph sur la survie des cellules de mélanome privées ou non de sérum.	121

Figure 53. Impact de l'inhibition de la GCase sur la sensibilité des cellules de mélanome humain A375 au dabrafénib.	123
Figure 54: Analyse des SL dans les différents modèles cellulaires étudiés.	125
Figure 55. Analyse sphingolipidomique (suite).	126
Figure 56. Rôle de la GCase dans le métabolisme de la GlcSph dans les cellules de mélanome A375.	128
Figure 57. Effet du CBE sur l'expression de l'alpha-synucléine dans les cellules de mélanome A375.	132
Figure 58. Effet de la GlcSph sur l'expression de l'alpha-synucléine dans les cellules de mélanome A375.	133
Figure 59. Génération de cellules de mélanome humain A375 surexprimant la forme sauvage ou mutée de la GCase.	150

Liste des tableaux

Tableau 1. Susceptibilité des patients Gaucher à développer un cancer (Dubot et al., 2020).	66
Tableau 2. Caractéristiques des patients Gaucher ayant développé un (ou plusieurs) cancer (Dubot et al., 2020).....	68
Tableau 3. Caractéristiques des cancers développés par les patients Gaucher (Dubot et al., 2020)... ..	69
Tableau 4: Altérations du métabolisme du céramide et effets associés dans diverses cellules cancéreuses.....	95

Avant-propos

La maladie de Gaucher : en quoi l'étude de ses causes peut nous informer sur le mélanome ou la maladie de Parkinson ?

La maladie de Gaucher est une affection rare due au déficit d'une enzyme appelée glucosylcéramidase (GCCase). Les patients atteints de cette maladie présentent une organomégalie et peuvent manifester des symptômes neurologiques. La GCCase a une fonction de dégradation dans le lysosome, le centre de recyclage de la cellule. Un certain parallèle avec notre situation climatique actuelle peut être fait : lorsque le centre de recyclage fonctionne mal, la quantité de débris non recyclés grandit, grandit jusqu'à la constitution d'un 7^{ème} continent plastique. De plus, l'agglomération des déchets conduit à la production de nouveaux déchets qui peuvent s'infiltrer partout comme les microparticules de plastique. Dans la maladie de Gaucher, le glucosylcéramide (GlcCer) qui s'accumule initialement se transforme en un autre lipide appelé glucosylsphingosine (GlcSph), physiologiquement à l'état de trace. Ces deux lipides seraient responsables des symptômes cliniques de la maladie de Gaucher. Ils appartiennent à une famille de graisses, les sphingolipides, découverts par J.L.W. Thudichum, qui leur a donné ce nom en référence au Sphinx de l'antiquité grecque en raison de leur côté énigmatique. Le Sphinx posait des énigmes aux voyageurs et leur réponse déterminait leur devenir (la vie ou la mort). Finalement, ces lipides, aujourd'hui mieux connus, ont également ce pouvoir de déterminer le devenir de la cellule.

La maladie de Gaucher est associée à deux pathologies plus fréquentes : la maladie de Parkinson, une maladie neurodégénérative dans laquelle une protéine appelée alpha-synucléine change de conformation, et le cancer, caractérisé par la prolifération incontrôlée de certaines cellules. Mieux comprendre en quoi le déficit en GCCase et la surcharge en GlcCer et/ou GlcSph influent sur l'émergence du syndrome parkinsonien ou d'une pathologie maligne peut nous aider à appréhender des mécanismes encore méconnus à l'origine de ces maladies. Ainsi, la compréhension des conséquences

d'un déficit d'une enzyme lysosomale, maladie rare, peut nous apporter des enseignements sur d'autres conditions plus communes. A travers le travail qui suit, nous avons tenté d'explorer ce type de liens.

Dans une première partie, une revue bibliographique de la GCCase et de ses pathologies associées (maladie de Parkinson et cancers) sera détaillée, puis le mélanome cutané et ses dérégulations du métabolisme des SL seront décrites. Ce premier travail permettra de mettre en évidence le rôle potentiel de la GCCase dans le mélanome cutané. Dans une deuxième partie, nous présenterons l'ensemble des résultats obtenus grâce à des modèles murins Gaucher et à des modèles cellulaires de mélanomes d'inhibition de la GCCase. Nos travaux expérimentaux seront divisés en 2 parties. La première s'articulera autour de l'effet de la GlcSph sur les cellules de mélanome et la deuxième autour de l'expression de l'alpha-synucléine. Puis, nous discuterons nos observations, dans une dernière partie, à la lumière des connaissances actuelles.

Revue bibliographique

I. La glucosylcéramidase : conséquences de son déficit en physiopathologie humaine

A. La glucosylcéramidase (ou GCCase)

1. Une enzyme lysosomale du catabolisme des glycosphingolipides

a) *Le lysosome*

Le lysosome, décrit par Christian de Duve dans les années 50, est un organite cytoplasmique délimité par une membrane dans lequel se déroule la dégradation de macromolécules (protéines, lipides, glucides, acides nucléiques) et de composants cellulaires dont les produits seront ensuite exportés par simple diffusion ou grâce à des transporteurs membranaires spécifiques puis réutilisés pour le métabolisme cellulaire ([Kolter and Sandhoff, 2010](#)). Ce catabolisme repose sur l'action de plus de 60 hydrolases acides, des enzymes spécifiques du type de liaison, parfois aidées par des activateurs, dans un environnement acide (pH entre 4.5 et 5), qui est maintenu par l'ATPase vacuolaire membranaire. La membrane lysosomale est caractérisée par de nombreuses protéines membranaires notamment les protéines hautement glycosylées appelées LAMP (*Lysosome-Associated Membrane Proteins*), des canaux ioniques et des transporteurs assurant l'homéostasie lysosomale. La face cytosolique du lysosome contient des facteurs permettant des interactions avec le reste de la cellule comme les SNAREs qui médient la fusion avec d'autres organites et les facteurs « tethering » ou des connexions facilitant les contacts avec les organites. Cette face est également le siège de phénomène de signalisation notamment avec la liaison au facteur de transcription TFEB (*Transcription Factor E Box*) (cf. Partie I.A.2). Enfin, la présence d'adaptateurs associés à de petites GTPases est retrouvée couple le lysosome au système des microtubules permettant la mobilité de ce dernier (Figure 1).

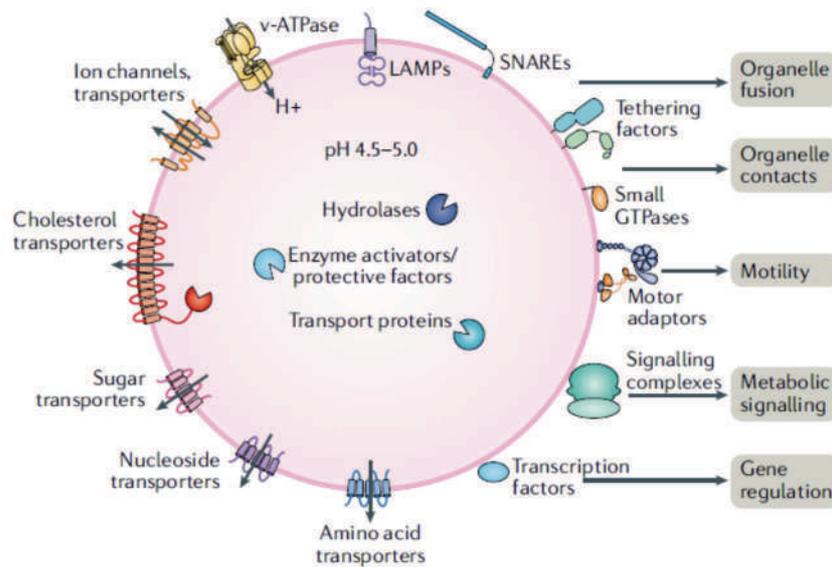


Figure 1. Le lysosome et ses caractéristiques (Ballabio and Bonifacio, 2020).

Les macromolécules à dégrader arrivent aux lysosomes par 2 grandes voies : le système endosomal et le système autophagique. Le système endosomal permet l'internalisation des macromolécules membranaires ou provenant du milieu extracellulaire *via* l'invagination de la membrane plasmique formant ensuite des endosomes (précoces puis tardifs) fusionnant avec le lysosome. Le système autophagique permet, quant à lui, de délivrer le contenu cytoplasmique aux lysosomes, *via* la formation d'un phagosome puis d'un autophagosome, une structure constituée d'une double membrane qui englobe les organites ou protéines et qui fusionne *in fine* avec le lysosome (Kolter and Sandhoff, 2010) (Figure 2).

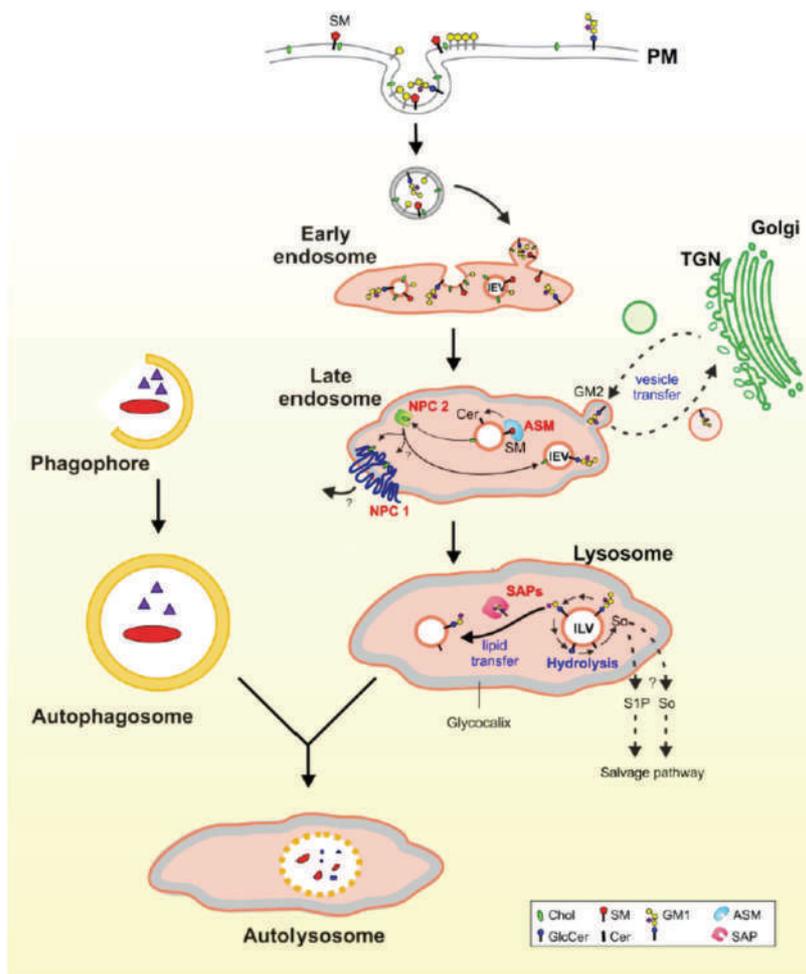


Figure 2. Les systèmes endo-lysosomal et autophagique.

Ce schéma illustre la voie autophagique (à gauche) et le catabolisme des lipides membranaires *via* la voie endolysosomale (à droite) dans une cellule neuronale (Breiden and Sandhoff, 2019). ASM: sphingomyélinase acide, Cer: céramide, Chol: cholestérol, GlcCer: glycosylcéramide, IEV: vésicule intraendosomale luminale, ILV: vésicule intralysosomale luminale, NPC: protéine Niemann–Pick type C, PM: membrane plasmatique, S1P: sphingosine-1-phosphate, SAP: activateur sphingolipidique.

Le lysosome est particulièrement étudié en raison de pathologies spécifiques associées, appelées maladies de surcharge lysosomale. Il existe plus de 70 maladies qui résultent d'un déficit en hydrolase (ou d'un activateur) ou d'un défaut de protéine membranaire (Platt et al., 2018). La Figure 3 illustre le catabolisme lysosomal d'une famille lipidique particulière appelée sphingolipide (SL) ainsi que les pathologies associées. Dans les chapitres suivants, nous nous intéressons à la glucosylcéramidase (GCCase), une hydrolase lysosomale qui dégrade le glycosylcéramide (ou GlcCer).

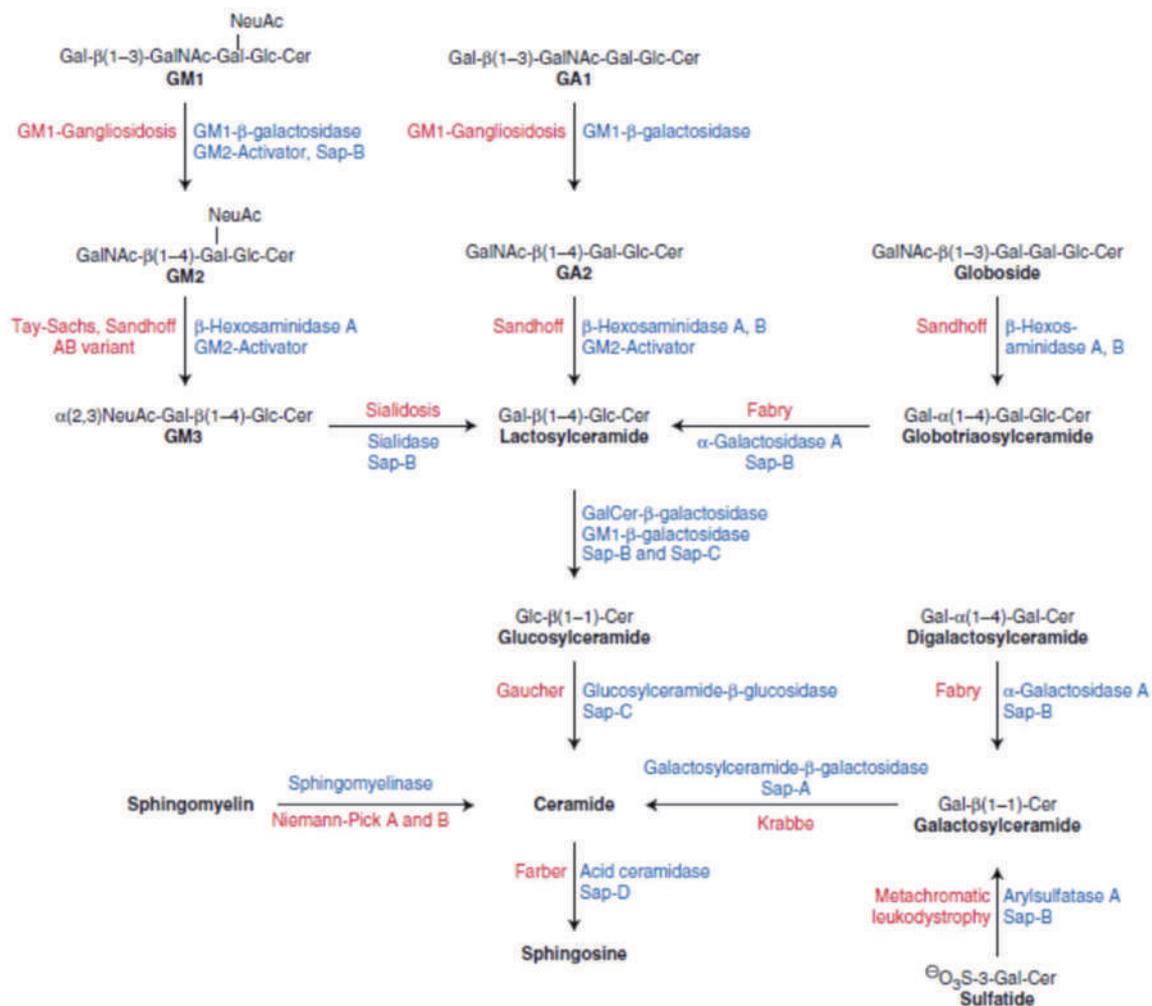


Figure 3. Catabolisme des sphingolipides et pathologies associées (Schulze and Sandhoff, 2011).

Les hydrolases lysosomales intervenant dans le catabolisme sont écrites en bleu avec ou non le nom de leur activateur protéique. Le nom de la maladie correspondant au déficit de l'enzyme est noté en rouge. Sap : saposine

La fonction de recyclage du lysosome est la plus étudiée mais il s'avère que celui-ci exerce d'autres fonctions le plaçant comme un acteur majeur du métabolisme cellulaire (Figure 1). Dans une revue récente, Ballabio et Bonifacino décrivent ces différents aspects et illustrent le rôle du lysosome dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson (cf. Partie I.C) ou le cancer (cf. Partie I.D) (Ballabio and Bonifacino, 2020; Platt et al., 2018).

Enfin, il est intéressant de noter qu'il existe des organites qui dérivent du système endolysosomal appelés lysosome-related organelles (LRO). Ce sont des organites avec une membrane possédant un contenu et une morphologie unique et des fonctions spécifiques en fonction du type cellulaire. Ils partagent avec les lysosomes un pH acide, des protéines de membrane (LAMPs) et des hydrolases ([Dell'Angelica et al., 2000](#)). Des pathologies associant les lysosomes et les LRO sont décrites comme les syndromes de Chediak-Higashi et d'Hermansky-Pudlak démontrant la relation étroite entre ces organites ([Dell'Angelica et al., 2000](#)). Dans ce manuscrit, nous évoquerons, deux types de LRO, les mélanosomes dans les mélanocytes (cf. Partie II.B.1) et les corps lamellaires dans les kératinocytes (cf. Partie I.A.6).

b) Le glucosylcéramide

Le GlcCer appartient à la famille des glycosphingolipides (GSL). Les GSL appartiennent avec la sphingomyéline (SM) à la famille des SLs complexes. Leur localisation est essentiellement membranaire (feuillet externe de la membrane plasmique) et leur expression est ubiquitaire. Les GSL sont composés du céramide (Cer), partie hydrophobe, et d'une chaîne oligosaccharidique extracytoplasmique. Cette dernière est antigénique et est à l'origine d'interactions entre les cellules et leur environnement. Le Cer est composé de la sphingosine (So) liée à un acide gras par une liaison amide (Figure 4). Il peut être synthétisé par différentes voies : i) la synthèse *de novo* à partir de la sérine et du palmitoyl-CoA, ii) la dégradation des GSL (et donc du GlcCer) et de la SM et iii) la voie de recyclage appelée « *salvage pathway* » à partir de la So (

Figure 5). Ensuite, le Cer peut être transformé en GlcCer grâce au transfert d'un glucose provenant de l'UDP-glucose par la glucosylcéramide synthase (GCS), codée par le gène *UGCG* au niveau de l'appareil de Golgi ([Ichikawa and Hirabayashi, 1998](#)). Le GlcCer est le précurseur de presque tous les GSL (> 300 espèces) par l'ajout de divers oses. Quant à leur dégradation, elle est principalement lysosomale et séquentielle (Figure 3 et Figure 5). Le GlcCer est dégradée par la GCase.

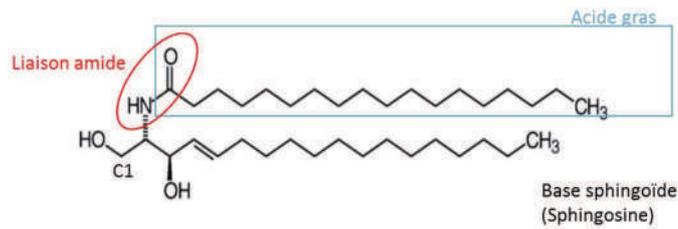


Figure 4. Structure du céramide.

Le Cer est composé de la So (C18 avec une double liaison en C4) lié à un acide gras par une liaison amide. Deux fonctions hydroxyles (OH) sont retrouvées en C1 et C3. La fonction OH en C1 permet sa liaison à un sucre, un phosphate ou un acide gras.

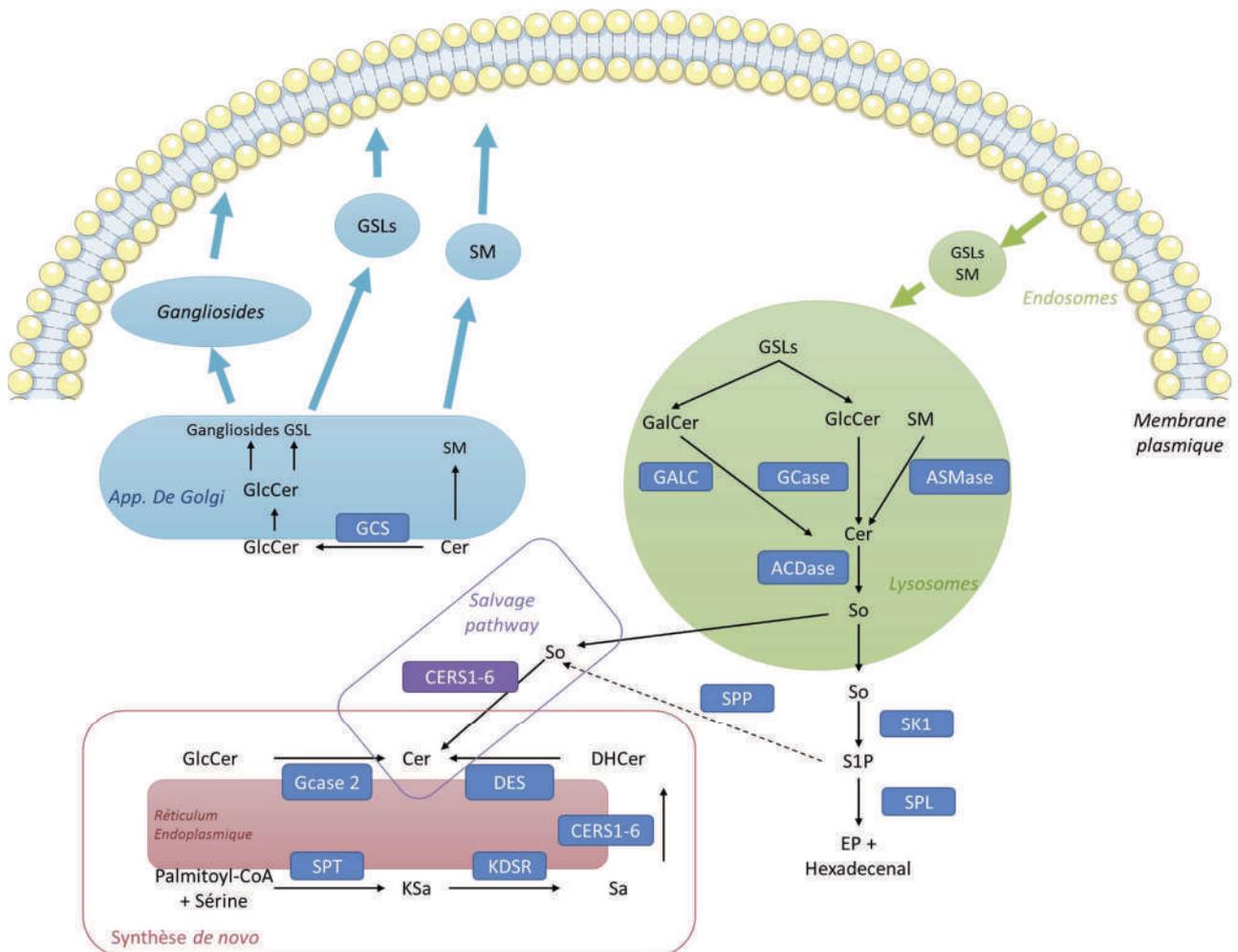


Figure 5. Compartimentalisation subcellulaire du métabolisme du céramide.

La **synthèse de novo** du Cer se déroule dans le RE (encadré rouge), à partir du Palmitoyl-CoA et de la sérine, sous l'action de la SPT. Le Cer est ensuite transporté dans l'appareil de Golgi, soit par transport vésiculaire, soit par un transporteur (non représentés) où vont être synthétisés les GSL, la SM et les gangliosides pour, ensuite, aller à la membrane plasmique par transport vésiculaire. Le **catabolisme** des lipides complexes se déroule dans le système endo-lysosomal. Ce catabolisme reforme du Cer qui sera hydrolysé par la ACDase en So. La So sort ensuite du lysosome (dont le mode de transport est

inconnu) et pourra soit phosphorylée en S1P par la SK1. Le **salvage pathway** (encadré violet), localisé au niveau du RE, correspond à la reformation du Cer à partir de la So. Soit la So est directement transformée en Cer par les CERS, soit la So doit être d'abord phosphorylée en S1P qui est ensuite déphosphorylée en So puis transformée en Cer.

SPT, sérine palmitoyltransférase; Ksa, 3- kétosphinganine; KDSR kétosphinganine réductase; Sa, sphinganine; CERS, céramide synthase; DHCer dihydrocéramide; DES, dihydrocéramide désaturase; Cer, céramide ; GCS, glucosylcéramide synthase; GlcCer, glucosylcéramide; GSLs, glycosphingolipides; SM, sphingomyéline, SMS, sphingomyéline synthase ; ACDase, céramidase acide; ASMase, sphingomyélinase acide; EP, éthanolamine1-phosphate; GALC, galactosylcéramidase; GalCer, galactosylcéramide; GCase, glucosylcéramidase; So, sphingosine; S1P, sphingosine 1-phosphate; SK, sphingosine kinase; SPL, sphingosine 1-phosphate lyase.

2. Le gène *GBA*

La GCase est codée par le gène *GBA*, localisé sur le chromosome 1q21, qui contient 11 exons et 10 introns s'étalant sur 7,6 kb. Il existe un pseudo-gène de 5,7 kb localisé 16 kb en aval partageant la même composition que le gène *GBA* à 96% ([Wafaei and Choy, 2005](#)) (**Figure 6**).

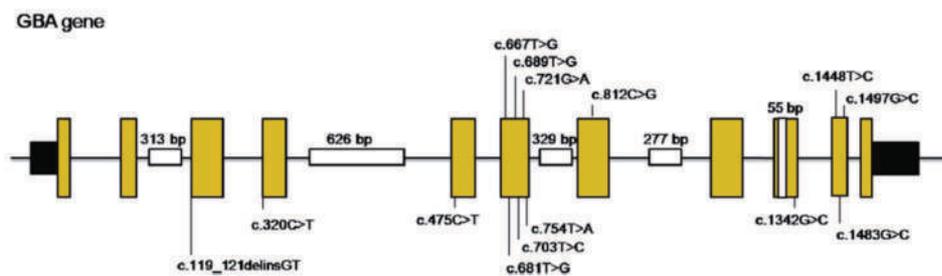


Figure 6. Structure du gène *GBA* et de son pseudo-gène.

Représentation schématique du gène *GBA* avec les exons représentés par les boîtes jaunes et les régions non traduites par les boîtes noires. Les boîtes blanches représentent les parties délétées (notamment la délétion de 55bp dans l'exon 9) dans le pseudo-gène et les variations inscrites sont les variations spécifiques du pseudo-gène permettant de différencier les 2 séquences ([Zampieri et al., 2017](#)).

Il existe deux sites d'initiation de la traduction ATG dans les exons 1 et 2, produisant deux polypeptides avec une séquence signal de longueur différente. Cependant, une seule protéine unique mature de 497 acides aminés sera produite ([Hruska et al., 2008](#); [Sorge et al., 1985](#)), la séquence signal étant clivée dans le réticulum endoplasmique (RE). Il était classique de nommer les mutations de *GBA* à partir du résidu alanine en position 40, désormais une nouvelle nomenclature se référant à la séquence

NM_000157.4 existe prenant en compte les 39 premiers acides aminés. Cependant dans la majorité des publications, les mutations sont encore annotées à partir de l'ancienne nomenclature avec donc une différence de 39 acides aminés.

Longtemps considéré comme un gène de ménage, peu d'études sur la régulation du gène *GBA* ont été réalisées. Cependant, une séquence particulière appelée CLEAR (*Coordinated Lysosomal Expression And Regulation*) est retrouvée localisée à 200 bp du site d'initiation de la transcription (TSS) du gène *GBA* indiquant que la transcription de *GBA* peut être régulée par le facteur de transcription TFEB ([Sardiello et al., 2009](#)). Ce facteur qui appartient à la sous-famille MiT avec MITF (*Microphtalmia-associated Transcription Factor*) et TFE3 (*Transcription Factor Binding To IGHM Enhancer 3*) est décrit comme le « *master regulator* » de la biogenèse et des fonctions lysosomales.

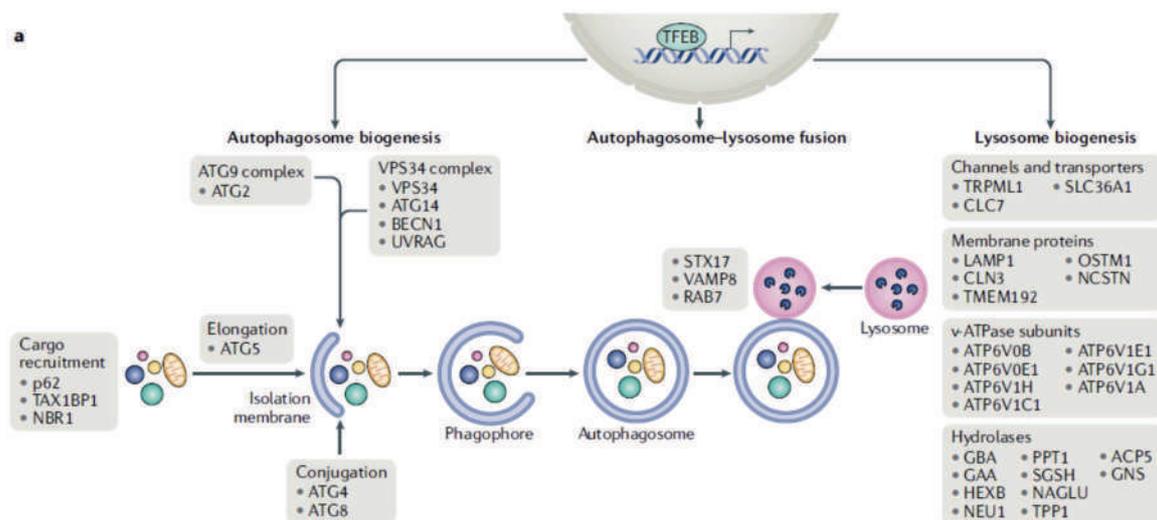


Figure 7. Rôles de TFEB.

TFEB est le facteur de transcription régulant la biogenèse de l'autophagosome et du lysosome ainsi que de leur fusion ([Ballabio and Bonifacio, 2020](#)). Il régule les fonctions lysosomales en activant notamment la transcription des gènes des hydrolases lysosomales comme *GBA*.

La régulation de TFEB dépend de son état phosphorylé ou non. Inactif, TFEB est cytosolique et phosphorylé. Sa phosphorylation peut être effectuée par 2 protéines : mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) ou MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) et survient en condition d'apport

en nutriment. A jeun ou en cas de dysfonction lysosomale, TFEB est déphosphorylé et transloqué dans le noyau où il active la transcription des gènes cibles ([Ballabio and Bonifacio, 2020](#)) (Figure 8).

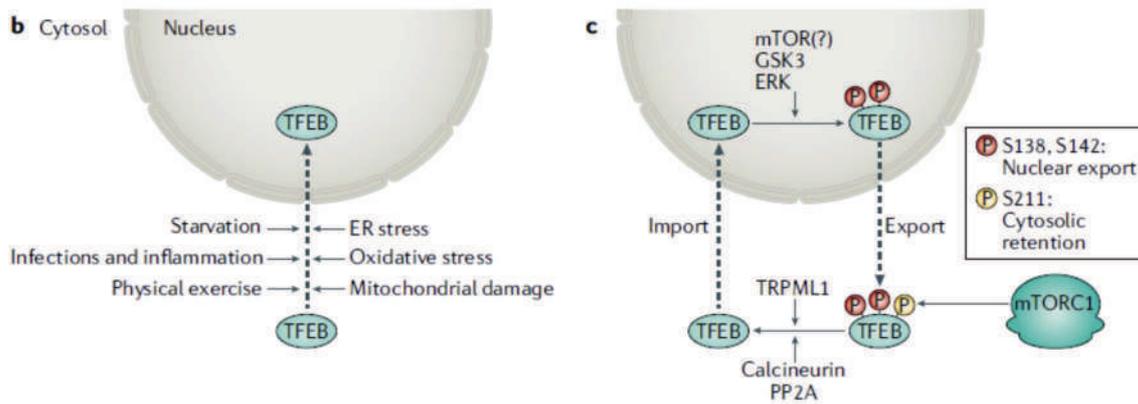


Figure 8. Régulation de TFEB.

L'activation de TFEB, c'est-à-dire sa translocation dans le noyau dépend de signaux de l'environnement tels que le jeun ou le stress du RE. La phosphorylation est le mécanisme de régulation de TFEB dont le principal acteur est mTORC. Phosphorylé (notamment sur la sérine 211), TFEB est séquestré dans le cytoplasme et inactif alors que déphosphorylé il devient actif, transloque dans le noyau et active la transcription des gènes cibles ([Ballabio and Bonifacio, 2020](#)).

3. La GCase

La GCase est synthétisée dans le RE où la protéine subit 4 N-glycosylations sur les résidus N58, N98, N185 et N309 ([Berg-Fussman et al., 1993](#)) dont seule la glycosylation de la N58 est essentielle pour l'activité catalytique, puis est transportée dans l'appareil de Golgi (Figure 9A). Cette protéine est constituée de trois domaines non contigus ([Dvir et al., 2003](#)) : le domaine I (résidus 40-66 et 422-453) 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 43-55 et 57-62), qui sont nécessaires pour un repliement correct. Le domaine II (résidus 69-114 et 470-536) composé de deux feuillets β -plissés associés fermement et formant un domaine indépendant, ressemble à un repliement de type immunoglobuline (Ig). Le domaine III (résidus 115-420 et 455-430) est un tonneau ou (β/α) triosephosphate isomerase (*TIM barrel*) qui contient le site catalytique dont les résidus essentiels E274

et E379. Les domaines II et III semblent être connectés par une charnière flexible, tandis que le domaine I interagit étroitement avec le domaine III (Figure 9B).

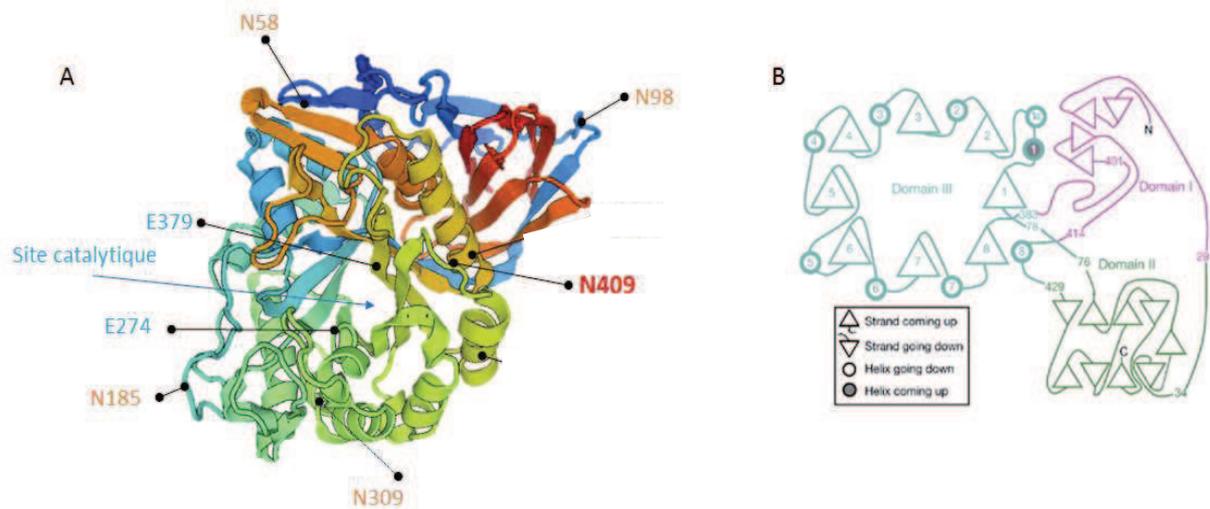


Figure 9. Structure de la GCCase.

A. Représentation tridimensionnelle de la GCCase (réalisée avec le site <https://swissmodel.expasy.org/>). En orange sont représentés les 4 sites de N-glycosylation, en bleu, les résidus du site actif et en rouge la localisation de l'acide aminé le plus fréquemment muté. **B.** Représentation schématique en 2-dimensions de la GCCase décrivant les 3 domaines ainsi que le sens des feuilletts β et des hélices α (Dvir et al., 2003).

La protéine mature est ensuite transportée jusqu'au lysosome par la liaison à la protéine LIMP2 (*Lysosomal Integral Membrane Protein 2*), ce qui diffère des autres enzymes lysosomales dont le transport dépend de l'ajout d'un mannose-6-phosphate (Reczek et al., 2007). La protéine LIMP2 est codée par le gène *SCARB2*, dont les mutations sont responsables d'un syndrome AMRF (Action myoclonus-renal failure) comprenant une épilepsie progressive myoclonique, une glomérulosclérose focale et une ataxie (Berkovic et al., 2008; Dibbens et al., 2016; Dubot et al., 2021). Bien que le déficit en LIMP2 entraîne un défaut de transport de la GCCase aux lysosomes avec sécrétion de l'enzyme dans le milieu extracellulaire, le tableau clinique est différent de celui d'un déficit en GCCase qui est responsable de la maladie de Gaucher (Partie I.B).

L'acidité du contenu lysosomal entraîne ensuite la dissociation de LIMP2 et de la GCCase, qui ira se localiser à la face interne de la membrane lysosomale (Schröder et al., 2007).

4. Les autres GCases

Dans les cellules de mammifères, deux autres isoformes existent : la GCCase2 et la GCCase3. La GCCase 2 est une enzyme non lysosomale, associée à la surface membranaire cytosolique du RE et du cis-Golgi, proche du site de synthèse du GlcCer ([Boot et al., 2007](#)). Elle aurait la même fonction catalytique que la GCCase et pourrait avoir un rôle dans la régulation de la synthèse des GSL ([Körschen et al., 2013](#)) (Figure 13) . Elle est codée par le gène *GBA2* porté par la région chromosomique 9p13.3. Le déficit de la GCCase 2 chez des souris est responsable d'une infertilité des mâles, et une accumulation du GlcCer est retrouvée en dehors des lysosomes dans des vésicules dans le foie et les testicules ([Yildiz et al., 2006](#)). Par contre, les patients porteurs de mutations homozygotes de *GBA2* présentent un tableau de paraplégie spastique héréditaire (SPG46) ([Sultana et al., 2015](#)).

La GCCase 3, nommée aussi la protéine apparentée à Klotho ou la β -glucosidase cytosolique humaine (hCBG), appartient à la famille des β -glucosidases, qui est capable d'hydrolyser une large variété de substrats osidiques associés à un groupe hydrophobe. Elle permettrait la détoxification de xénobiotiques glucosylés ([Marques et al., 2016](#)). *In vitro*, la GCCase 3 semble peu active sur l'hydrolyse du GlcCer.

5. Fonctions biologiques de la GCCase

a) *Activité hydrolytique*

La GCCase (ou glucocérébrosidase ; E.C.3.2.1.45) est une β -glucosidase acide qui hydrolyse la liaison β -glycosidique du GlcCer en glucose et Cer. Le Cer, qui est hydrophobe, sera ensuite déacylé par la céramidase acide (ACDase) en So pour ensuite sortir du lysosome (Figure 5).

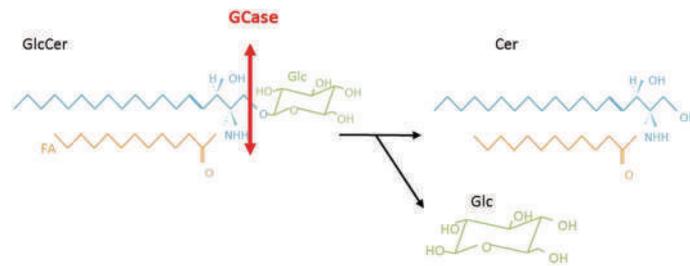


Figure 10. Hydrolyse du GlcCer par la GCase.

Cer, céramide; FA, acide gras ; Glc, glucose.

Cette hydrolyse nécessite la présence d'un cofacteur protéique, la saposine C (SapC) et de phospholipides chargés négativement ([Lieberman, 2011](#); [Wilkening et al., 1998](#)) (Figure 11). La SapC permettrait la liaison pH-dépendante de l'enzyme avec le GlcCer. Elle provient du clivage protéolytique d'une protéine précurseur, la prosaposine, codée par le gène *PSAP*, dont les mutations entraînant une perte de fonction sont responsables d'un tableau clinique comparable au déficit de la GCase responsable de la maladie de Gaucher (cf. Partie I.B) ([Tamargo et al., 2012](#)).

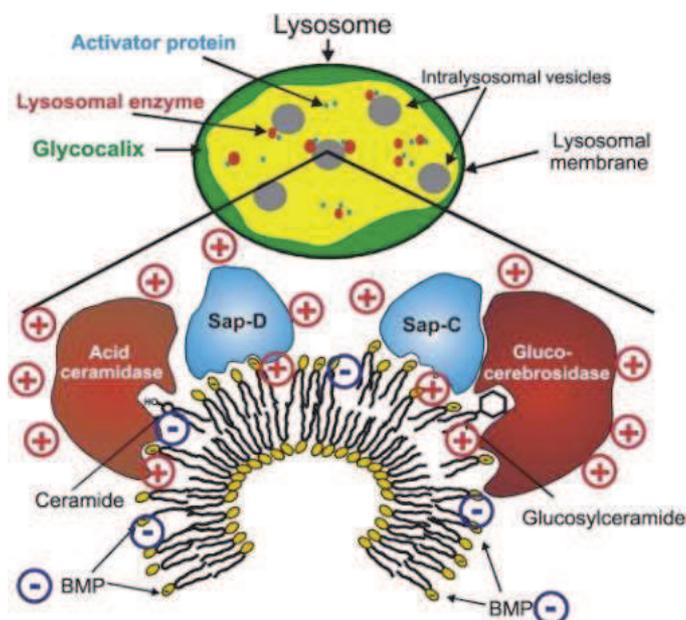


Figure 11. Action de la GCase et de la ACDase sur leurs substrats.

A pH acide, les enzymes lysosomales cationiques comme la GCase et l'ACDase se lient à la membrane interne lysosomale enrichie en BMP chargé négativement et ont leur activité catalytique exacerbée par la présence d'activateur comme la SapC pour la GCase et la SapD pour l'ACDase. BMP, bis(monoacylglycero)phosphate; Sap-D, saposine D; Sap-C, saposine C ([Schulze and Sandhoff, 2014](#)).

L'activité catalytique de la GCase peut être inhibée de façon irréversible *in vitro* (mais aussi chez l'animal) par plusieurs drogues comme le conduritol B epoxide (CBE) ou le cyclophellitol ([Kuo et al., 2019](#)) (Figure 12).

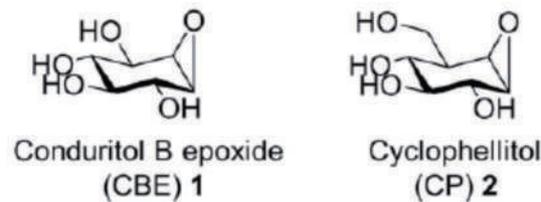


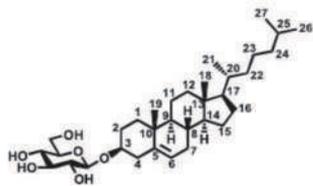
Figure 12. Structure de certains inhibiteurs de la GCase ([Kuo et al., 2019](#)).

Le déficit de l'activité enzymatique de la GCase secondaire à des mutations constitutionnelles pathogènes homozygotes ou hétérozygotes composites du gène *GBA* est responsable d'une maladie lysosomale appelée la maladie de Gaucher (cf. Partie I.B.).

b) Transglucosylation

Des observations très récentes montrent que la GCase serait capable de catalyser une réaction de transglucosylation, permettant ainsi la synthèse ou la dégradation de stérylglycosides ([Akiyama et al., 2013](#)). La GCase pourrait former du glucosylcholestérol (GlcChol) quand la concentration intralysosomale de cholestérol (Chol) augmente, ce qui est le cas dans la maladie de Nieman-Pick type C ([Heybrock et al., 2019](#); [Marques et al., 2016](#)). Cependant en condition normale, la GCase dégraderait le GlcChol alors que la GCase 2 (cytoplasmique) synthétiserait le GlcChol. Ce rôle versatile de la GCase dépendrait des concentrations locales des donneurs de glucose (GlcCer ou GlcChol) et des accepteurs de glucose (Cer et Chol). Toutefois, le rôle de ces stérylglycosides reste encore inconnu. Ils seraient présents dans le thymus, le nerf sciatique, le cerveau et les poumons de souris ([Marques et al., 2016](#)) (Figure 13).

A



1-O-Cholesteryl- β -D-glucopyranoside
(β -GlcChol)

B

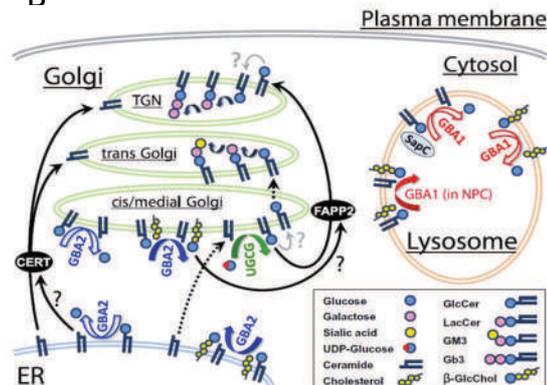


Figure 13. GCase et transglucosylation.

A. Structure du GlcChol. B. La GCase2 hydrolyserait le GlcCer présent au niveau des membranes du RE et de l'appareil de Golgi et pourrait aussi transférer le Glc sur le Chol formant du GlcChol alors que dans le lysosome, en condition normale, la GCase (GBA1) hydrolyserait le GlcCer ainsi que le GlcChol. Dans la maladie de Niemann Pick type C (NPC), la GCase aurait toutefois la capacité de former du GlcChol car la concentration de Chol intralysosomale augmente. La protéine CERT est la protéine de transport non vésiculaire du Cer depuis le RE vers l'appareil de Golgi ; FAPP2, four-phosphate adaptor protein 2 est la protéine de transport du GlcCer au travers de l'appareil de Golgi ([Akiyama and Hirabayashi, 2017](#)).

6. La GCase au niveau cutané

A côté de sa fonction dans le lysosome, la GCase a la capacité d'hydrolyser le GlcCer en dehors de la cellule. Cette fonction constitue un rôle majeur dans la composition de la peau et l'homéostasie cutanée. L'épiderme est un épithélium de revêtement, stratifié, pavimenteux et kératinisé. C'est la couche la plus superficielle de la peau, en contact avec l'extérieur qui assure la fonction essentielle de barrière. L'épiderme assure aussi une protection vitale vis-à-vis de la déshydratation et de la pénétration d'agents infectieux, chimiques ou physiques comme les rayons ultraviolets (UV). Brièvement, il est composé de quatre types cellulaires: les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel, et est constitué de 4 couches épidermiques qui sont, de la profondeur vers la surface : la couche basale, la couche de Malpighi ou couche spiculée, la couche granuleuse et la couche cornée (Figure 14).

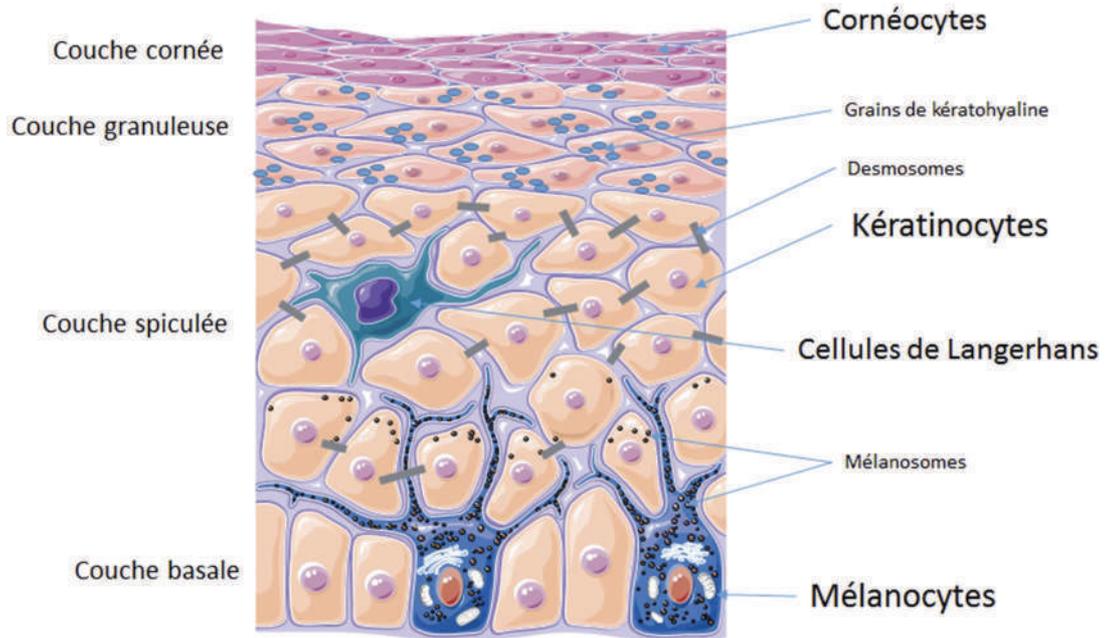


Figure 14. Structure de l'épiderme (Servier Art Medical)

La couche cornée correspond à des kératinocytes différenciés en cornéocytes. Ces derniers sont des cellules anucléées formant des lamelles qui perdent progressivement leur cohésion et desquament. Ces cellules sont maintenues dans une matrice extracellulaire lipidique, constituée d'environ 50% de Cer, 25% de Chol, 15% d'acides gras libres et un peu de phospholipides ([Feingold and Elias, 2014](#)). Cette répartition est essentielle à la rétention d'eau et aux mouvements électrolytiques ([Rinnerthaler et al., 2013](#)). Cette matrice proviendrait du contenu des corps lamellaires (CL) des kératinocytes de la couche granuleuse. Ces CL, appartenant à la famille des LRO, contiennent des précurseurs lipidiques comme le GlcCer, et également des enzymes telles que la GCCase. Ainsi, une fois leur contenu libéré dans le milieu extracellulaire, la GCCase hydrolyse le GlcCer en Cer participant à la fonction protectrice de la peau (Figure 15).

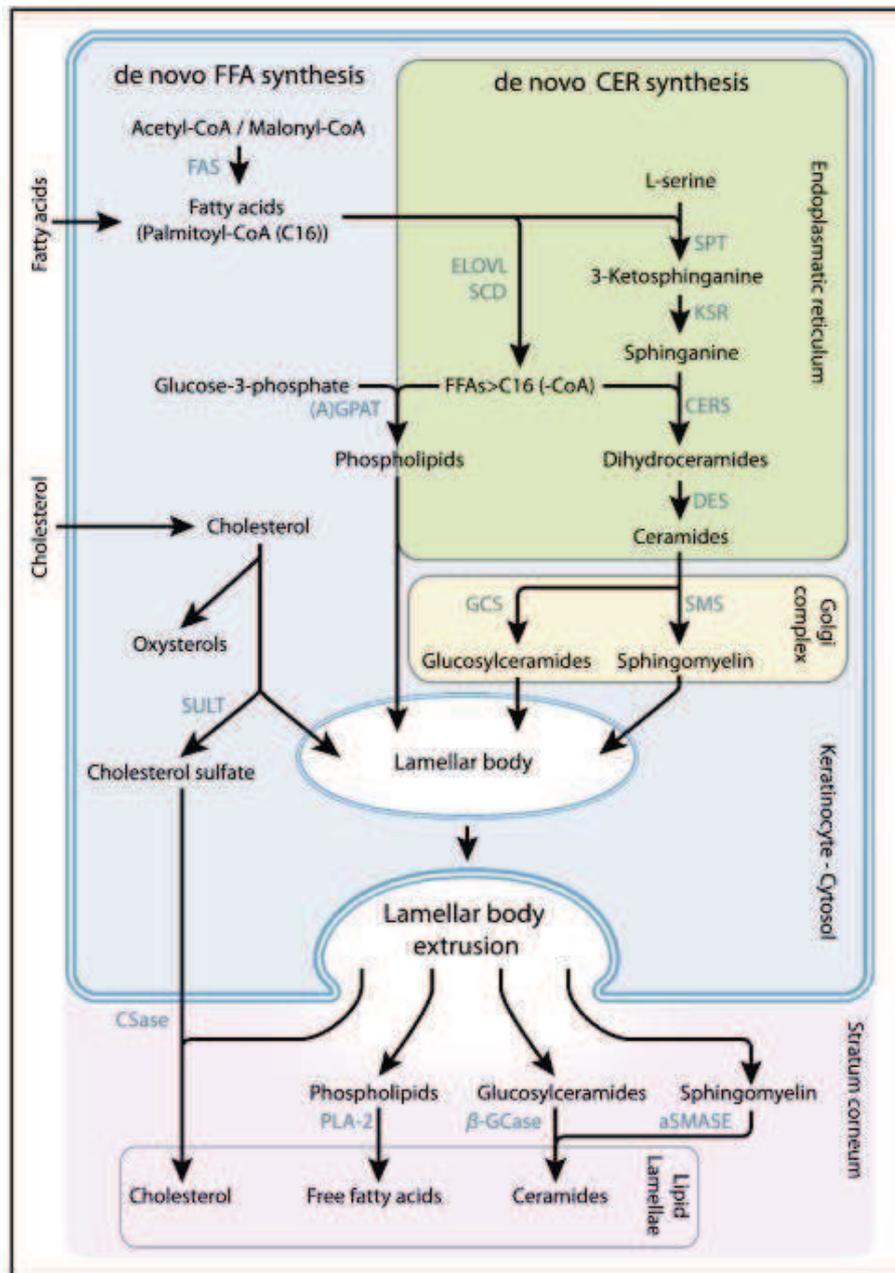


Figure 15. Rôle de la GCase dans l'épiderme (van Smeden et al., 2014).

Représentation schématique des étapes enzymatiques permettant la formation de la matrice extracellulaire lipidique de la couche cornée. En bleu sont nommées les enzymes.

FAS, fatty acid synthase; ELOVL, elongation of very long chain fatty acids family (1 to 7); SCD, stearoylCoA desaturase; SPT, serine palmitoyltransferase; KSR, 3-ketosphinganine reductase; (A)GPAT, (acyl)glycerol-3-phosphate acyltransferase; CERS, ceramide synthase family (1 to 6); DES, dihydroceramide desaturase (1 and 2); GCS, glucosylceramide synthase; SMS, sphingomyelin synthase; SULT, cholesterol sulfotransferase type 2B isoform 1b; CSase, cholesterol sulfatase; PLA-2, phospholipase; β-GCase, β-glucocerebrosidase; aSMASE, acid sphingomyelinase.

B. Maladie de Gaucher

La maladie de Gaucher, due au déficit fonctionnel de la GCase, est une maladie autosomique récessive décrite par Philippe Gaucher ([Gaucher, 1882](#)) et serait la plus commune des maladies de surcharge lysosomale ([Stirnemann et al., 2017](#)).

1. Epidémiologie

La maladie de Gaucher est une maladie rare avec une incidence entre 0,4 et 5,8 sur 100 000 habitants pouvant atteindre 1/800 naissances dans la population juive Ashkénaze et une prévalence variant de 0,70 à 1,75 pour 100 000 habitants ([Nalysnyk et al., 2017](#); [Stirnemann et al., 2017](#)). En France, en 2012, l'incidence était de 1 sur 50 000 naissances et la prévalence était de 1/136 000 ([Stirnemann et al., 2012](#)).

2. Tableau clinique

La maladie de Gaucher présente une hétérogénéité clinique importante. Trois phénotypes cliniques sont définis selon la présence et la sévérité de signes neurologiques.

a) Type 1 ou forme non neuropathique

Le type 1 représente la forme la plus commune avec une prévalence de 90-95% en Europe et en Amérique du Nord ([Stirnemann et al., 2017](#)). La présentation est variable, allant du tableau cliniquement asymptomatique aux formes plus sévères avec un début précoce dans l'enfance. Le type 1 est caractérisé par une hépatosplénomégalie, des cytopénies (anémie et thrombopénie), des anomalies osseuses (déformations osseuses en flacon d'Erlenmeyer, ostéopénie, fractures pathologiques, infarctus osseux, ostéonécrose) et des anomalies pulmonaires mais sans atteinte neurologique. Les patients développent aussi des douleurs chroniques et une fatigue.

b) Type 2 ou forme neuropathique

Le type 2 représente moins de 5% des patients et se caractérise par une atteinte neurologique sévère et précoce entraînant une neurodégénérescence rapide (débutant généralement entre 3 et 6 mois) ([Stirnemann et al., 2017](#)). Les patients meurent généralement dans les 3 premières années de vie.

Le tableau clinique est dominé par des signes de neurodégénérescence comme l'arthrogrypose, l'apnée, l'hypertonie, l'hypokinésie, le strabisme pouvant évoluer vers l'épilepsie et l'opisthotonos, des signes d'atteinte bulbaire, et une paralysie oculomotrice supra nucléaire horizontale. L'hépatosplénomégalie et les anomalies cytologiques sont également retrouvées ([Weiss et al., 2015](#)).

On distingue dans le type 2 les formes périnatales létales : l'hydrops fœtal et le bébé collodion. Ce dernier présente un phénotype cutané particulier dans lequel le nouveau-né est enveloppé dans une membrane rigide, tendue et vernissée ressemblant à une pellicule de collodion séchée. Il s'agit d'un état transitoire, évoluant en quelques semaines vers une ichtyose de forme variable. Cette forme particulière montre le rôle important de la GCase dans la biologie de la peau (cf. Partie I.A.6).

c) Type 3

Le type 3 présente une atteinte viscérale avec une hépatosplénomégalie et une atteinte neurologique mais contrairement au type 2, cette atteinte débute plus tardivement (8 ans) et est lentement progressive ([Stirnemann et al., 2017](#)). La présentation clinique de ce type est très hétérogène. La forme la plus caractéristique présente une atteinte systémique sévère avec une paralysie oculomotrice supranucléaire horizontale avec ou non un retard psychomoteur.

Ce large spectre clinique peut rendre le diagnostic difficile avec un risque d'errance et donc de complications. Cependant, le diagnostic positif est relativement accessible et repose sur le dosage de l'activité résiduelle de la GCase et sur l'analyse moléculaire du gène *GBA*.

3. Diagnostic biologique

a) *De certitude*

Le dosage de l'activité enzymatique résiduelle de la GCCase est réalisé sur des cellules de type leucocytes, fibroblastes, trophoblastes, cellules amniotiques ou dans le plasma ([Nguyen et al., 2019](#)). Dans la maladie de Gaucher, une nette diminution de l'activité résiduelle est retrouvée. Le diagnostic reposera ensuite sur l'identification de mutants pathogènes dans le gène *GBA*. Plus de 450 mutations causales sont décrites, dont 70% sont des substitutions ponctuelles se situant dans l'exon 8 et 9 ([Hruska et al., 2008](#)). Le reste étant des mutations non-sens, des insertions-délétions, ou encore des allèles complexes comme des événements de recombinaisons de type conversion génique avec le pseudo-gène en raison de leur proximité géographique et leur haut degré de similitude (transfert de séquence de *GBAP* vers *GBA*) amenant à une séquence aberrante ([Zampieri et al., 2017](#)).

La corrélation génotype-phénotype n'est pas totalement établie et un même génotype peut être associé à des phénotypes différents. Quelques mutations seulement sont associées à un type et au pronostic de la maladie, comme les mutations p.N409S (anc. p.N370S) associée au type 1 et p.L483P (anc. p.L444P) associée au type 2.

D'autres marqueurs peuvent être dosés pour établir le diagnostic, le pronostic et le suivi sous traitement.

b) *Dosage de marqueurs de l'activation macrophagique*

La chitotriosidase est un marqueur de l'activation macrophagique dont l'activité augmente nettement dans la maladie de Gaucher (x 600 comparé à des sujets contrôles) ([Hollak et al., 1994](#)). La mesure de l'activité plasmatique de cette hydrolase est réalisée pour le diagnostic ainsi que pour le suivi des patients traités, car elle diminue sous traitement. Cependant, certains individus présentent un variant (une duplication de 24pb dans l'exon 10) dans le gène de la chitotriosidase *CHIT1*, à l'état hétérozygote

ou homozygote, responsable d'un déficit partiel ou total de l'activité, qui est non pathogène. Dans ce cas particulier, la mesure de l'activité chitotriosidase n'est pas contributive.

Le CCL18 (aussi nommé PARC pour *Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine*) est une chimiokine sécrétée par les macrophages dont le taux plasmatique augmente dans la maladie de Gaucher (x 10-50 comparé à des sujets contrôles) ([Boot et al., 2004](#); [Deegan et al., 2005](#)). Comme la chitotriosidase, ce dosage est utile au diagnostic (Figure 16) ainsi qu'au suivi sous traitement.

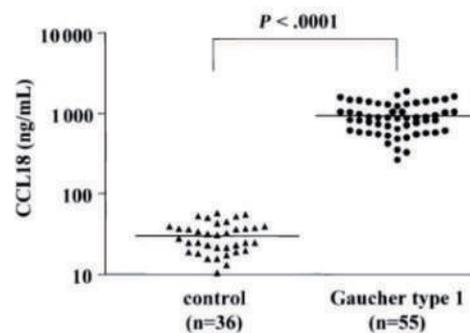


Figure 16. Taux plasmatique (ng/ml) de CCL18 chez les patients Gaucher versus témoins ([Boot et al., 2004](#)).

Suite à l'analyse du protéome de rate de patients atteints par la maladie de Gaucher, un nouveau biomarqueur a été identifié : la glycoprotéine gpNMB dont l'expression est augmentée dans cette pathologie ([Kramer et al., 2016](#)) (Figure 17). Sa fraction soluble a été validée comme un nouveau biomarqueur de la maladie de Gaucher ([Murugesan et al., 2018](#)). GpNMB est sécrétée par les cellules de Gaucher et reflèterait la surcharge lipidique des macrophages. A notre connaissance, ce dosage n'est cependant pas utilisé en pratique.

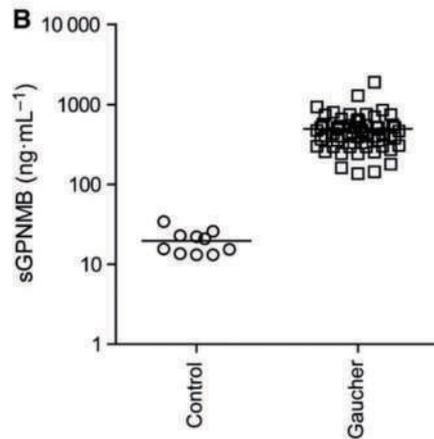


Figure 17. Taux plasmatique (ng/ml) de la fraction soluble de gpNMB chez les patients Gaucher type 1 versus témoins (Kramer et al., 2016).

c) *La glucosylsphingosine ou Lyso-gb1*

Même si le dosage plasmatique du GlcCer permet de distinguer les sujets atteints de la maladie de Gaucher des sujets sains (Groener et al., 2008), le dosage d'un autre lipide appelé glucosylsphingosine (GlcSph ou Lyso-gb1) est beaucoup plus discriminant, ce qui en fait un biomarqueur très spécifique et sensible (Dekker et al., 2011a; Rolfs et al., 2013) (Figure 18). Le taux moyen chez les patients Gaucher est 224nmol/L (Pettazzoni et al., 2017). A noter que le taux n'est pas augmenté chez les patients hétérozygotes (Rolfs et al., 2013) (Figure 19). L'origine de ce lipide est expliquée dans la partie .I.B.4.a).

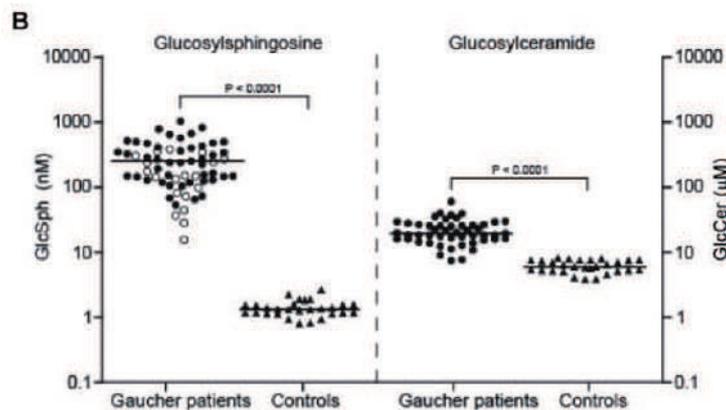


Figure 18. Taux plasmatique de GlcSph (nM) et GlcCer (μM) chez des patients Gaucher versus témoins (Dekker et al., 2011a).

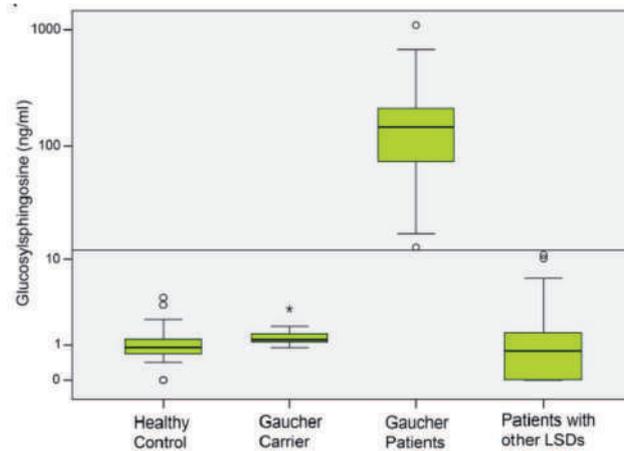


Figure 19. Taux plasmatique de GlcSph (ng/ml) dans différentes cohortes.

Taux plasmatique de GlcSph (ng/ml) chez des patients porteurs d'un mutant de *GBA* (Gaucher carrier), chez des patients Gaucher et chez des patients atteints par d'autres maladies de surcharge lysosomale comparé à des individus contrôles. La ligne horizontale indique le seuil pathologique (12 ng/ml) ([Rolfs et al., 2013](#)).

4. Physiopathologie

La physiopathologie de la maladie de Gaucher n'est pas encore totalement élucidée mais de très nombreux travaux ont été réalisés afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu.

a) Toxicité directe du GlcCer et de la GlcSph

L'analyse anatomopathologique de rate et de foie de patients Gaucher retrouve une organomégalie avec une infiltration de grandes cellules de surcharge associée à une inflammation ([Carubbi et al., 2020](#); [James et al., 1981](#)). Ces grandes cellules sont des macrophages surchargés en GlcCer appelées cellules de Gaucher. Ces macrophages sont les principales cellules atteintes en raison de leur rôle de phagocytose des globules rouges contenant beaucoup de GSLs, générateurs de GlcCer. L'accumulation du GlcCer dans les macrophages transforme ces derniers en cellules de Gaucher, qui sont de grandes cellules (20 à 100µm) avec un noyau excentré, une chromatine dense et un cytoplasme avec un aspect de papier froissé, ou présentant des stries cytoplasmiques épaisses colorées au May-Grünwald Giemsa ou avec des dépôts lamellaires dits en « bulbe d'oignon » ([Dalbies et al., 2009](#)) (Figure 20).

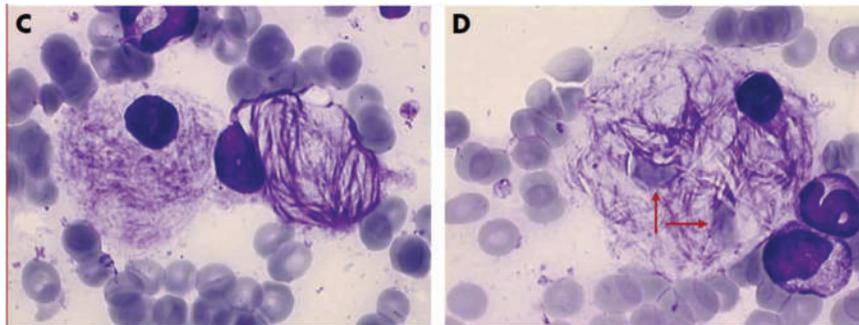


Figure 20. Cellules de Gaucher retrouvées au myélogramme.

Sur la photo de droite, les 2 flèches rouges montrent 2 érythrocytes phagocytés ([Dalbies et al., 2009](#)).

Des macrophages de patients Gaucher ou issus de cellules souches pluripotentes (IPSC ou *induced pluripotent stem cells*) obtenues à partir de fibroblastes de patients Gaucher présentent une accumulation de GlcCer qui diminue suite au traitement par une protéine chaperonne indiquant le rôle de la GCase dans la génération de ces cellules. Ces macrophages surchargés restent efficaces quant à leur capacité de phagocytose de bactéries mais présentent une réduction de production d'espèces réactives de l'oxygène et de leur chimiotactisme ([Aflaki et al., 2014](#)) témoignant de modifications fonctionnelles. En effet, ces macrophages affichent un phénotype particulier appelé alternativement activé correspondant à des macrophages de type M2 ([Boven et al., 2004](#)). Comme décrit chez l'homme, dans un modèle murin Gaucher (9V/null), l'infiltration des organes par les cellules de Gaucher est associée à une inflammation avec une infiltration de cellules immunitaires et une production de cytokines et de chimiokines ([Pandey et al., 2014](#); [Pandey et al., 2012](#); [Xu et al., 2003](#)). De plus, l'analyse du plasma de patient Gaucher a révélé une augmentation des taux de cytokines pro et anti-inflammatoires, dont IL-1 β , TNF- α , IL-10 et IL-6 ([Allen et al., 1997](#); [Boven et al., 2004](#); [Jmoudiak and Futerman, 2005](#); [Lo et al., 2010](#); [Michelakakis et al., 1996](#)). Cela suggère que les cellules de Gaucher pourraient participer à la survenue d'une inflammation qui expliquerait notamment les douleurs chroniques et la fatigue ([Kantha et al., 2020](#)) ainsi que certaines complications de la maladie de Gaucher (cf. Partie I.D).

Une accumulation de GlcCer et de GlcSph est aussi retrouvée dans la rate et le foie de patients Gaucher quel que soit le type ainsi que dans la moelle osseuse et dans les poumons ([Burrow et al., 2015](#); [Nilsson et al., 1982](#); [Raghavan et al., 1974](#)). La GlcSph correspond à la forme N-déacylée du GlcCer vraisemblablement suite à l'action de la ACDase ([Ferraz et al., 2016](#)).

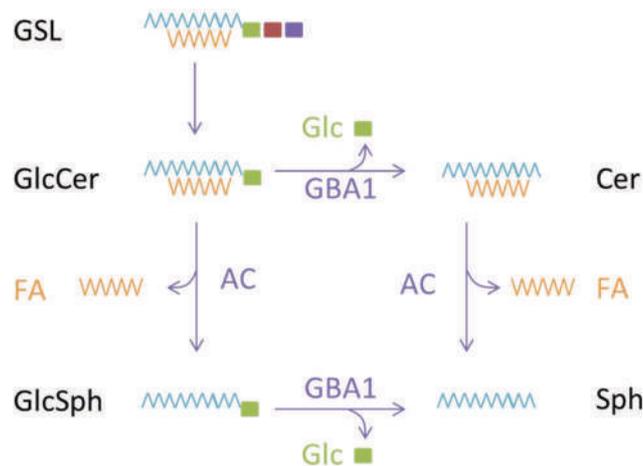


Figure 21. Formation de la GlcSph.

GSL, Glycosphingolipides ; GlcCer, Glucosylcéramide ; Cer, céramide; FA, acide gras ; Glc, glucose. ; So, sphingosine, AC, cér amidase acide.

Cette forme est plus hydrophile que le GlcCer lui permettant de traverser les membranes et de se retrouver dans le plasma ce qui rend la GlcSph facilement dosable et en fait donc un biomarqueur ([Revel-Vilk et al., 2020](#)) (cf. Partie I.B.3.c). Le traitement par enzymothérapie permet de réduire l'organomégalie, les cytopénies, les atteintes osseuses et les taux plasmatiques de GlcCer et GlcSph ([Weinreb et al., 2002](#)), ce qui a été retrouvé dans un modèle murin Gaucher (9V/null) ([Xu et al., 2003](#)) ([Marshall et al., 2010](#)). Ainsi l'hépatosplénomégalie et les cytopénies sont très probablement secondaires à l'infiltration des cellules de Gaucher qui sont la source de GlcCer et GlcSph.

Dans un autre modèle murin (4L/PS-NA), équivalent à un Gaucher type 3, une nette accumulation de GlcCer et GlcSph est retrouvée notamment dans le cerveau, ce qui n'est pas le cas dans les autres

modèles murins ([Sun et al., 2005](#)). Ce modèle développe à 10 semaines de vie des troubles neurologiques (ataxie, tremblement jusqu'à la paralysie complète à 20 semaines) suggérant un rôle de ces lipides dans la survenue des troubles neurologiques. Une neuroinflammation est constatée avec une astrocytose et l'activation de la microglie au niveau du cortex et de l'hippocampe ainsi qu'une perte neuronale dans le cervelet ([Schiffer et al., 2020](#)). Ces observations sont concordantes avec l'étude histologique de 14 cerveaux post-mortem de patients Gaucher tout type confondu. Tous les cerveaux présentaient des modifications au niveau de l'hippocampe (zones CA2-4) et dans les couches corticales 3 et 5. Seul le degré d'altération semblerait permettre de différencier les sous-types avec une astrocytose pour le type I et une perte neuronale pour les types II et III ([Wong et al., 2004](#)). La présence de cellules de Gaucher a également été décrite dans cette étude au niveau péri-vasculaire de tous les patients et en plus dans le parenchyme de l'hippocampe et du striatum chez les patients Gaucher type 2 ([Wong et al., 2004](#)). Dans le modèle murin neuronopathique de Gaucher ($Gba^{flox/flox}; nestin-Cre$) ([Enquist et al., 2007](#)) où seuls les neurones, astrocytes et oligodendrocytes présentent un défaut de GCase, une surcharge en GlcCer dans les neurones, et une production de cytokines (IL-1 β , TNF α) par la microglie (dont la GCase est normale) ont été observées ([Vitner et al., 2012](#)). Cela suggère que l'atteinte de la microglie n'est pas le premier évènement dans la pathogénie des troubles neurologiques mais elle serait secondaire à la surcharge en GlcCer des neurones suggérant une communication du neurone vers la microglie. La GlcSph n'a pas été dosée dans ce modèle mais pourrait être ce moyen de communication. En effet, les cerveaux de patients Gaucher de type 2 présentent des taux très élevés de GlcSph par rapport aux deux autres formes ([Orvisky et al., 2002](#)). Cela a été reproduit dans un modèle murin de Gaucher type 2 qui retrouvait en plus une augmentation de la GlcSph *in utero* ([Orvisky et al., 2000](#)). L'étude *in vitro* de l'effet de la GlcSph sur les neurones montre un effet toxique générant des dysfonctions cellulaires ainsi que de la mort ([Schueler et al., 2003](#)). Toutes ces données suggèrent le rôle potentiel du GlcCer et de la GlcSph dans la neurodégénérescence et la neuroinflammation retrouvées dans le type 2 et 3.

De plus, dans des neurones obtenus par différenciation d'iPSC provenant de fibroblastes Gaucher, un blocage de l'autophagie avec une altération des fonctions lysosomales et une diminution de l'expression de TFEB sont retrouvées ; les deux sont rétablis par le traitement par enzyme substitutive. De plus, l'inhibition de la GCS en vue de diminuer l'accumulation de GlcCer rétablit les fonctions lysosomales. Ces résultats évoquent le rôle de l'accumulation du GlcCer secondaire au déficit en GCase dans l'altération de la voie autophagique ([Awad et al., 2015](#)). Dans un autre travail, la diminution de l'activation de TFEB observée serait secondaire à une hyperactivité de mTOR qui est réversée par l'inhibition de la GCS ([Brown et al., 2019](#)). Ces anomalies ont été retrouvées dans des PBMC (*peripheral blood mononuclear cell*) de patients Gaucher ([Ivanova et al., 2019](#)). De plus, dans un modèle drosophile de Gaucher neuropathique, l'altération de l'autophagie participerait au développement de la neurodégénérescence ([Kinghorn et al., 2016](#)). Enfin, une hypothèse a été proposée selon laquelle la survenue des troubles neurologiques résulterait de l'accumulation secondaire de protéines polyubiquitinylées non dégradées en raison d'un défaut de l'autophagie, liée à l'accumulation des lipides ([Kinghorn et al., 2016](#)).

D'autres métabolites pourraient s'accumuler secondairement à la surcharge en GlcCer/GlcSph. En effet, dans un modèle de macrophages THP-1 traités au CBE, l'accumulation de GlcCer entraîne l'accumulation secondaire de lipides perturbant le trafic endo-lysosomal et générant un engorgement lipidique ([Hein et al., 2007](#)). L'accumulation secondaire d'autres GSL dans la membrane plasmique modifie les propriétés membranaires avec une diminution de la fluidité et de l'endocytose ainsi que la composition des rafts lipidiques pouvant perturber des voies de signalisation ([Batta et al., 2018](#)). Le GlcCer retrouvé dans les cerveaux Gaucher proviendrait du catabolisme des gangliosides, appartenant à la famille des GSL et une augmentation du ganglioside GM3 serait retrouvée dans les cerveaux de patients Gaucher ([Nilsson and Svennerholm, 1982](#)). Dans le plasma, cette élévation serait associée à l'insulinorésistance décrites chez certains patients Gaucher ([Ghauharali-van der Vlugt et al., 2008](#)).

Enfin, une élévation du taux plasmatique de GlcChol est décrite chez des patients Gaucher type 1 non traités et symptomatiques ; ce taux diminue sous traitement par un inhibiteur de la GCS (éliglustat) ([Marques et al., 2016](#)). Le rôle de ces stérylglycosides reste inconnu dans la pathogénie de la maladie de Gaucher.

Dans la majorité des cas de maladie de Gaucher, les mutations pathogènes ne sont pas à l'origine d'une altération du site catalytique de la GCCase mais à l'origine d'une protéine mal repliée.

b) Défaut conformationnel

Dans la maladie de Gaucher, les molécules de GCases mal repliées subissent une rétention variable dans le RE, ce qui génère un stress et met en route le système de dégradation liée au RE (ERAD) dans le protéasome. La sévérité de la maladie de Gaucher serait liée à au degré de rétention et de dégradation des GCases mutées ([Ron and Horowitz, 2005](#)). Pour un bon maintien de l'homéostasie cellulaire, la réponse cellulaire adaptative nommée UPR (*Unfolded Protein Response*) est ensuite déclenchée *via* la protéine chaperonne BIP (*Binding Immunoglobulin Protein*) qui se lie aux protéines mal repliées libérant les 3 activateurs suivants: PERK (*PKR-like ER kinase*) et son effecteur principal eIF2 α (*eukaryotic translation initiation factor 2, subunit α*), IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*) avec XBP1 (*X box-binding protein 1*) et ATF6 (*activating transcription factor 6*). Ceci conduit à la diminution de la synthèse protéique et la dégradation des protéines mal repliées notamment. L'échec de cette réponse à rétablir l'homéostasie déclenche un signal dit « terminal » de l'UPR caractérisé par l'activation de signaux de mort cellulaire. Par exemple, l'hyperactivation de PERK active l'expression d'un facteur de transcription CHOP (*C/EBP homologous protein*) qui va inhiber BCL-2 (*B-cell lymphoma-2*), protéine anti-apoptotique, et activer BIM, pro-apoptotique convergeant vers l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose ([Hetz and Papa, 2018](#)) (Figure 22). La nécroptose pourrait également participer à la mort induite par l'UPR. Parallèlement au déclenchement de la mort cellulaire, l'UPR peut contribuer au développement de l'inflammation ([Hetz and Papa, 2018](#)).

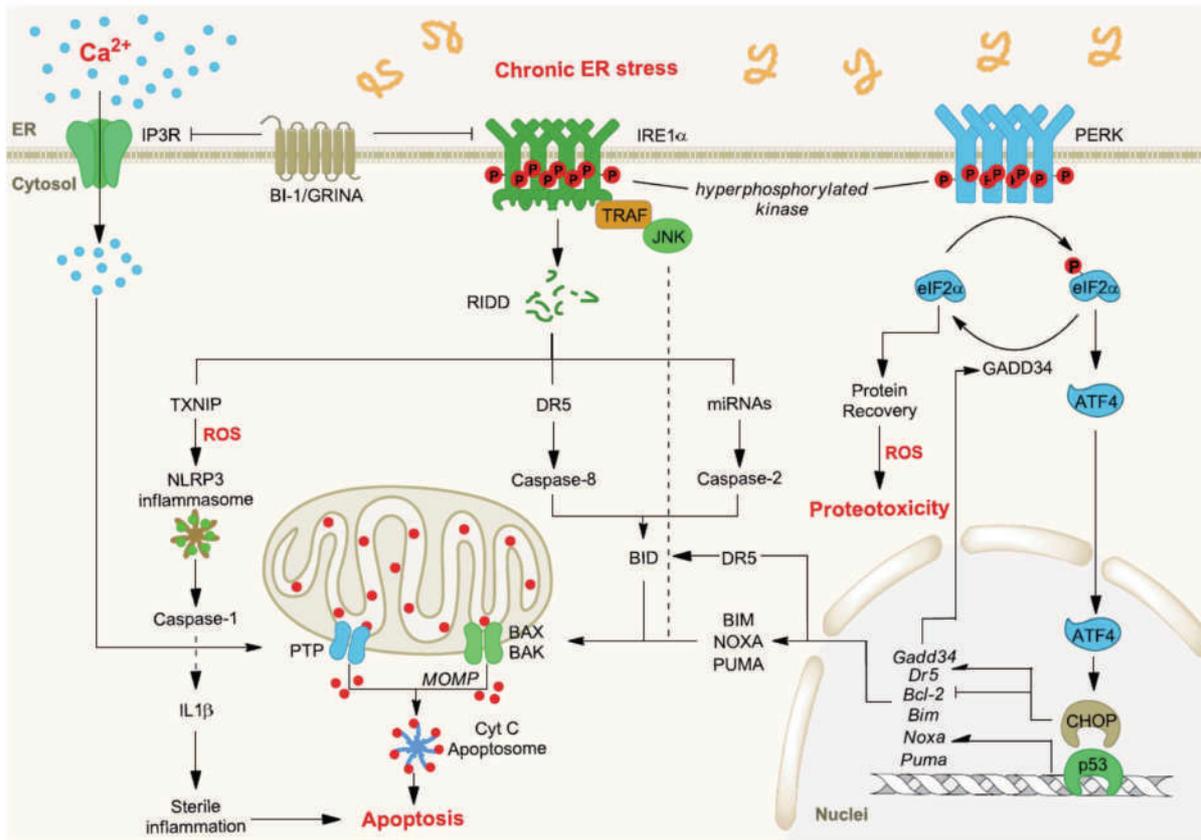


Figure 22. Rôle de l'UPR dans l'apoptose (Hetz and Papa, 2018).

Quand le RE est exposé à un stress chronique, PERK et IRE1 α conduisent à l'activation de l'inflammasome et de l'apoptose. Le cross-talk entre la mitochondrie et le RE participe à la régulation de l'apoptose *via* les modifications transcriptionnelles et post-transcriptionnelles des protéines de la famille BCL-2. De plus, le relargage de calcium du RE, l'augmentation de synthèse protéique ainsi que la production de ROS participent à l'induction de l'apoptose.

Dans les fibroblastes cutanés de patients Gaucher et d'individus porteur à l'état hétérozygote de mutant *GBA*, l'activation de l'UPR est retrouvée avec l'activation de la chaperonne BiP et du facteur CHOP. Cette réponse UPR ne serait pas déclenchée par l'accumulation de GlcCer mais uniquement par les mutants mal repliés. Cela a été reproduit dans le modèle drosophile de la maladie de Gaucher qui présente des troubles neurologiques (Maor et al., 2013). La réponse UPR entraînerait également secondairement une augmentation de la transcription du gène *GBA* *via* l'action du facteur de transcription CHOP (Braunstein et al., 2018), ce qui probablement augmente la rétention de mutants et donc le stress du RE. L'expression de mutant *GBA* dans un modèle cellulaire de glioblastome (U87)

retrouve l'UPR associée à une production d'IL-1 β reflétant l'activation constitutive de l'inflammasome ([Pavan et al., 2020](#)). Ainsi la réponse UPR participerait à la neuroinflammation des patients Gaucher.

c) *Adaptations métaboliques secondaires*

Bien que la GCCase hydrolyse le GlcCer en Cer, son déficit enzymatique chez les patients Gaucher n'est pas associé à une diminution du taux plasmatique de Cer indiquant que le métabolisme des SL est interconnecté et en équilibre avec des conséquences notamment sur les activités de la GCS et de la GCCase2 ([Groener et al., 2008](#)).

Peu de travaux sur la GCS ont été réalisés et seule l'augmentation de l'expression du gène *UGCG* a été décrite ([Pandey et al., 2017](#)) (cf. Partie I.D.2).

Le rôle de la GCCase2 reste aujourd'hui indéterminé dans la physiopathologie de la maladie de Gaucher. Une diminution seule de l'activité GCCase2 (et pas de l'expression protéique) a été décrite dans des modèles *vitro* et *vivo* d'inhibition de la GCCase et cet effet dépendrait de l'activité de GCCase, uniquement dans ce sens. La GlcSph produite dans la maladie de Gaucher pourrait être hydrolysée par la GCCase2 cytosolique et ainsi produire de la So qui pourrait inhiber directement la GCCase2 ([Schonauer et al., 2017](#)). Toutefois, dans un modèle murin de Gaucher type 1 (Mx1-Cre+:GD1), l'inhibition de la GCCase2 améliore le phénotype viscéral, hématologique et osseux ([Mistry et al., 2014](#)) et n'entraîne pas l'augmentation de l'accumulation de GlcSph par rapport au modèle GCCase2 sauvage ([Mistry et al., 2014](#)). Cela a été également reproduit dans un modèle de poisson zèbre ([Lelieveld et al., 2019](#)), indiquant que la GCCase2 n'hydrolyserait pas la GlcSph. Quant à GCCase3, aucun rôle n'a été retrouvé jusqu'à présent ([Dekker et al., 2011b](#)).

En conclusion, le déficit en GCase, *via* l'accumulation de GlcCer et/ou de GlcSph et *via* les mutants, cause de nombreuses altérations cellulaires comme le défaut de clairance de protéines, de l'inflammation ou des altérations des propriétés membranaires (Figure 23) pouvant être à l'origine de pathologies neurodégénératives ou malignes (cf. Parties I.C et I.D).

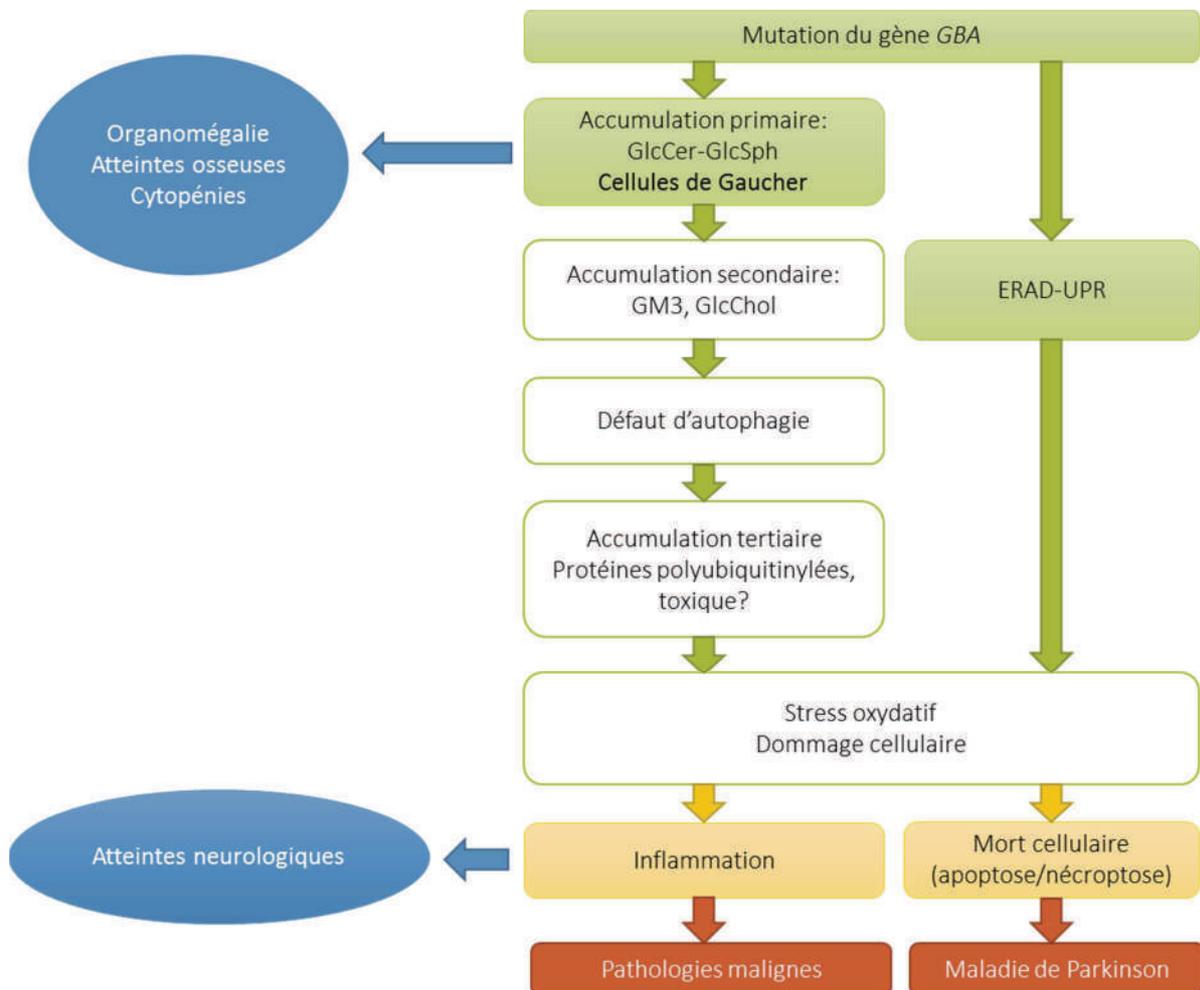


Figure 23. Physiopathologie de la maladie de Gaucher.

Ce schéma, inspiré de la revue de Breiden et Sandhoff ([Breiden and Sandhoff, 2020](#)), illustre les mécanismes physiopathologiques décrits dans la maladie de Gaucher (encadrés en vert) associés aux signes cliniques (encadrés en bleu) et les complications associées à la maladie de Gaucher (encadré en rouge).

5. Prise en charge thérapeutique

Parallèlement à la prise en charge symptomatique, il existe 2 types de traitements médicamenteux spécifiques de la maladie de Gaucher : l'enzymothérapie substitutive (ou ERT, *Enzyme Replacement Therapy*) qui est le traitement de référence et les réducteurs de substrats (ou SRT, *Substrate Reduction Therapy*). Le premier vise à restaurer la dégradation du GlcCer accumulé en apportant l'enzyme, le second vise à limiter la synthèse du GlcCer. Sans prise en charge, la morbi-mortalité augmente chez les patients Gaucher. La maladie peut évoluer vers une fibrose hépatique et pulmonaire, des infections, et les complications de la splénomégalie ([Nguyen et al., 2019](#)). A noter qu'aucun traitement à ce jour n'a montré d'efficacité sur les symptômes neurologiques.

Le traitement spécifique n'est cependant pas justifié chez tous les patients atteints de la maladie de Gaucher. La prise en charge est décidée en réunion pluridisciplinaire spécialisée du comité d'évaluation des traitements de la maladie de Gaucher (CETG) et repose sur la présence d'un ou plusieurs critères clinico-biologiques (non décrits ici) ([PNDS, 2015](#)).

a) *Enzymothérapie substitutive (ou ERT)*

L'ERT est prescrite en première intention pour les formes de type 1 et 3 ([PNDS, 2015](#)). Cette thérapie permet de corriger directement l'activité enzymatique déficiente en administrant une GCCase humaine recombinante. Deux produits sont commercialisés en France : imiglucérase (CEREZYME[®], enzyme recombinante humaine produite par des cellules CHO (*Chinese hamster ovary*)) et vélaglucérase alpha (VPRIV[®], enzyme dérivée de fibroblastes humains). L'efficacité et la tolérance de ces 2 protéines recombinantes sont similaires ([Weinreb et al., 2013](#); [Zimran et al., 2013](#)). L'administration de ces molécules se fait par voie intraveineuse tous les 15 jours. Il existe aussi une 3^{ème} ERT destinée uniquement aux patients adultes de la maladie de Gaucher : la taliglucérase alfa (ELELYSO[®], enzyme

produite par des cellules de carotte) qui n'est pas commercialisée en France, mais qui peut être utilisée dans le cadre d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) nominative ([Pastores et al., 2016](#)).

b) Réducteurs de substrats (ou SRT)

Deux réducteurs de substrats sont aujourd'hui commercialisés en France : le miglustat (ZAVESCA®) et l'éliglustat (CERDELGA®). Le miglustat est un iminosucre, inhibiteur de la GCS (enzyme qui synthétise le GlcCer) (Figure 24). Il est administré par voie orale et est capable de passer la barrière hématoencéphalique. C'est un traitement de seconde intention car souvent mal toléré sur le plan digestif et décevant sur le plan neurologique ([Weinreb et al., 2005](#)).

L'éliglustat, un analogue du Cer, inhibe aussi la GCS de façon plus spécifique que le miglustat (Figure 24). Les études cliniques montrent une efficacité de cette molécule versus placebo et une non-infériorité par rapport à l'imiglucérase ([Cox et al., 2015](#)). Cette molécule est administrée par voie orale. Elle est métabolisée par l'isoforme 2D6 du cytochrome P450 dont l'activité varie selon les patients. Le statut métaboliseur des patients est déterminé avant mise sous traitement. Ainsi, les métaboliseurs rapides et intermédiaires recevront 2 gélules par jour alors que les métaboliseurs lents ne recevront qu'une gélule.

Très récemment, le venglustat a été élaboré. Il correspond à une optimisation de l'éliglustat afin d'atteindre le système nerveux central ([Wilson et al., 2020](#)) (Figure 24). Comme l'éliglustat, il est un inhibiteur de la GCS et serait indiqué pour la forme type 3 mais aussi pour d'autres maladies lysosomales (maladie de Parkinson associée à des mutations de *GBA*, maladie de Fabry, GM2 gangliosidose) ([Peterschmitt et al., 2021](#)). Un essai clinique (NCT02843035) est actuellement en cours chez des patients Gaucher de type 1 et 3, en combinaison avec le CEREZYME.

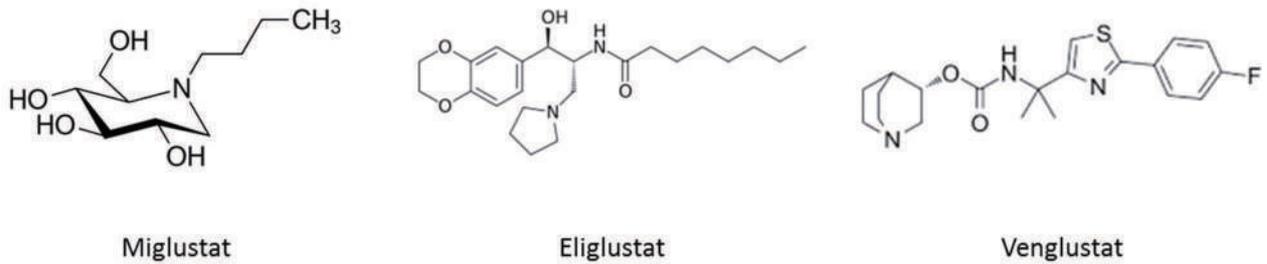


Figure 24. Structure des molécules SRT.

c) Greffe de moelle osseuse

Comme la physiopathologie de la maladie de Gaucher repose sur la surcharge lipidique des macrophages, la greffe de moelle osseuse a été proposée très tôt. De nombreux cas ont été rapportés montrant une efficacité de cette procédure sur l'organomégalie, les troubles osseux et même sur la détérioration neurologique dans le Gaucher de type 3. Cependant, la greffe est associée à une morbi-mortalité très importante liée à la procédure elle-même. Ainsi la greffe est généralement proposée qu'en ultime recours ([Somaraju and Tadepalli, 2017](#)).

d) Nouvelles thérapies en développement

Les thérapies actuellement disponibles (ERT et SRT) sont onéreuses et ne permettent pas le passage des molécules thérapeutiques au travers de la barrière hémato-encéphalique ; ainsi d'autres stratégies thérapeutiques sont en cours de développement.

La thérapie génique pourrait être une option afin d'améliorer les troubles neurologiques. L'injection d'un adénovirus-associé sérotype 9 (AAV9) portant le gène *GBA* sous le contrôle d'un promoteur spécifique des cellules neuronales (AAV9.hSYNI.hGBA) a été testée à J1 de vie dans un modèle murin Gaucher neuronopathique (K14-InI). Ces animaux présentent une durée de vie augmentée par rapport aux souris non traitées avec une amélioration des troubles neurologiques et viscéraux et n'ont pas développé de neurodégénérescence ([Massaro et al., 2020](#)).

Une autre stratégie est d'amener de petites molécules pouvant passer la barrière hémato-encéphalique. Ces molécules dites chaperonnes pharmacologiques ont été élaborées pour stabiliser l'enzyme (empêcher le mauvais repliement) et ainsi permettre son transfert du RE vers le lysosome. On décrit des molécules compétitives, qui se lient au niveau du site actif dont les 2 plus connues sont l'Isogomine et l'Ambroxol. L'Ambroxol est connu comme mucolytique dans le traitement d'affections bronchiques aiguës et d'épisodes aigus des bronchopneumopathies chroniques. L'étude pilote dans laquelle 5 patients Gaucher neuronopathiques recevaient une forte dose d'Ambroxol associée à l'ERT, a montré l'absence de toxicité et d'effets indésirables, une augmentation de l'activité enzymatique dans les lymphocytes, la diminution de la GlcSph dans le LCR ainsi qu'une amélioration des troubles neurologiques ([Narita et al., 2016](#)). Ces observations encourageantes ont mené à la mise en place d'une étude observationnelle rétrospective actuellement en cours sur l'effet de l'Ambroxol chez les patients Gaucher de tout type et chez les patients atteints de la maladie de Parkinson porteurs de mutants *GBA* (NCT04388969) (cf. partie 1.C).

A côté des molécules compétitives, d'autres petites molécules pourraient avoir un potentiel thérapeutique. Des chaperonnes non-compétitives ont été identifiées (NCGC607 et NCGC758) à partir de technique de screening haut débit sur des extraits de rates de patient Gaucher ainsi que des inhibiteurs des acétylases des histones (HDACi) (cf. la revue ([Han et al., 2020](#))).

Actuellement, les traitements disponibles sont principalement efficaces sur l'atteinte viscérale et peu voire pas du tout sur l'atteinte neurologique. La prise en charge de cette atteinte constitue un enjeu majeur, d'autant plus que la neurodégénérescence retrouvée dans la maladie de Gaucher pourrait participer au développement de la maladie de Parkinson. En effet, des mutations de *GBA* à l'état homozygote mais aussi à l'état hétérozygote sont fréquemment retrouvées chez des patients atteints de la maladie de Parkinson et sont même considérées comme le premier facteur de risque de cette pathologie (Figure 23).

C. Maladie de Parkinson

1. Présentation clinique et thérapeutique

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative complexe et progressive. En France, par ordre de fréquence, c'est la deuxième maladie neurodégénérative après la maladie d'Alzheimer.

L'incidence de la maladie de Parkinson varie de 5 à 35 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants. L'incidence augmente avec l'âge (x5 à x10 de la 6^{ème} à la 9^{ème} décennie) ([Simon et al., 2020](#)). En France, d'après l'HAS, la prévalence a été estimée, en 2005, à 827,5 pour 100 000 habitants. L'âge médian au diagnostic est environ de 60 ans ([Jankovic and Tan, 2020](#)).

Le tableau clinique comprend des signes moteurs décrivant le syndrome parkinsonien composé du tremblement de repos, d'une spasticité plastique (roue dentée), d'une bradykinésie voire d'une akinésie (ralentissement moteur) et d'une instabilité posturale ([Jankovic and Tan, 2020](#)). Cependant, une période prodromique est classiquement décrite avec des manifestations cliniques non spécifiques telles que des troubles olfactifs, des altérations cognitives, des signes psychiatriques, des douleurs, une fatigue, ou une dysautonomie ([Jankovic and Tan, 2020](#)).

Le diagnostic repose essentiellement sur la clinique (syndrome parkinsonien et période prodromique) et sur la sensibilité des signes moteurs à la L-Dopa ou aux agonistes dopaminergiques. Quant au diagnostic de certitude, il repose sur l'analyse anatomo-pathologique du cerveau qui ne peut être bien évidemment réalisée que post-mortem.

La maladie de Parkinson est une maladie évolutive. C'est la deuxième cause de handicap chez la personne âgée en raison de la progression des troubles moteurs évoluant vers une atteinte axiale et devenant généralement résistants aux traitements. De même, les troubles non moteurs se majorent avec notamment la survenue de démence, source de détérioration non négligeable de la qualité de vie.

2. Pathogénie de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est caractérisée par la dégénérescence des neurones dopaminergiques à l'origine de troubles moteurs *via* le déficit en dopamine. Ces neurones sont localisés dans la substance noire compacte située dans le mésencéphale. Cette zone est nommée substance noire en raison du contenu en neuromélanine, qui a une fonction neuroprotectrice face au stress oxydant.

Chez la plupart des patients, il s'agit d'un processus de dégénérescence primaire (maladie de Parkinson idiopathique), d'origine multifactorielle résultant de facteurs environnementaux comme l'exposition aux pesticides et le mode de vie ([Simon et al., 2020](#)) et de facteurs génétiques ([Puschmann, 2013](#)).

Des inclusions intracellulaires appelées corps de Lewy contenant des agrégats d'alpha-synucléine ont été mis en évidence par l'étude anatomo-pathologique post-mortem de cerveaux de patients atteints de Parkinson ([Okazaki et al., 1961](#); [Spillantini et al., 1997](#)) postulant le rôle de l'alpha-synucléine dans la pathogenèse de la maladie de Parkinson.

a) L'alpha-synucléine

L'alpha-synucléine, qui est codée par le gène *SNCA*, est une protéine de 143 acides aminés, localisée au niveau des terminaisons synaptiques ainsi que dans le noyau du neurone (d'où elle tire son nom, syn pour synapse et nucléine pour noyau). Dans la revue de Butler *et al.*, les auteurs font la synthèse des études portant sur le rôle de l'alpha-synucléine dans la neurotransmission dopaminergique et montrent que la surexpression de l'alpha-synucléine dans les neurones pourrait vraisemblablement interférer avec la synthèse et le stockage de la dopamine, amenant à une diminution de libération de la dopamine à l'origine des symptômes ([Butler et al., 2017](#)). La surexpression de l'alpha-synucléine inhibe l'action de la tyrosine hydroxylase qui permet la synthèse de la dopamine ainsi que la synthèse de la neuromélanine, et altère la formation des vésicules de stockage de la dopamine (VMAT2). Ces vésicules permettent de protéger la cellule vis-à-vis des métabolites de la dopamine formés qui sont toxiques en générant un stress oxydant ([Xu et al., 2002](#)). Enfin, des mutations dans le gène *SNCA*

codant pour l'alpha-synucléine sont associées à des formes autosomiques dominantes de la maladie de Parkinson. Trois mutations ponctuelles sont classiquement décrites p.A53T, p.A30P et p.E46K mais les amplifications (duplications et triplications) géniques sont les plus fréquentes ([Puschmann, 2013](#)). Le modèle murin exprimant le mutant A53T récapitule le phénotype parkinsonien ([Giasson et al., 2002](#)).

Des agrégats d'alpha-synucléine se forment en raison d'un mauvais repliement de la protéine devenant insoluble. L'alpha-synucléine prend alors une conformation en feuillet β permettant son association en fibrille amyloïde appelée aussi oligomères jusqu'à la constitution d'agrégats (Figure 25). Le mécanisme à l'origine de cette transition est encore mal connu et constitue un enjeu pour la compréhension et la prise en charge de la maladie de Parkinson.

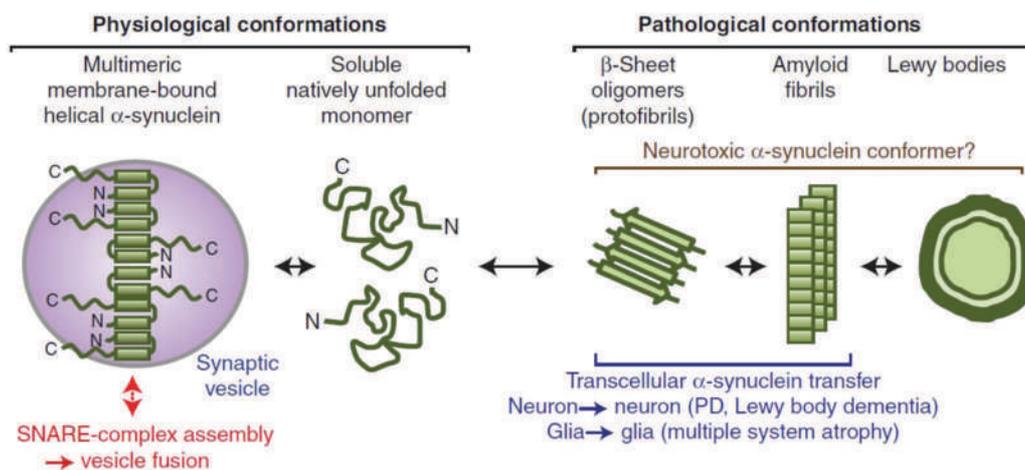


Figure 25. Conformations physiologiques et pathologiques de l'alpha-synucléine d'après ([Burre et al., 2018](#)).

La conformation physiologique de l'alpha-synucléine est un sujet controversé. En effet, l'alpha-synucléine est une protéine difficile à étudier par les techniques biochimiques classiques. Généralement dans la littérature l'alpha-synucléine «physiologique» est décrite comme une protéine monomérique de 18kDa non repliée qui prend une configuration hélicoïdale lors de sa liaison avec des lipides membranaires (Figure 25). En utilisant des techniques plus spécialisées sur des cellules intactes,

l'équipe de Dettmer montre que l'alpha-synucléine existe sous 2 formes en équilibre à l'état physiologique, la forme monomérique de 18kDa et la forme tétramérique de 60kDa ([Dettmer et al., 2015](#)). La formation d'agrégat serait secondaire à une diminution du ratio tétramère/monomère. L'alpha-synucléine retrouvée dans la maladie de Parkinson est également phosphorylée sur le résidu sérine 129 (P-S129 alpha-synucléine) ([Fujiwara et al., 2002](#)).

L'analyse des mécanismes impliqués dans la dégradation de l'alpha-synucléine indique que différents mécanismes sont mis en jeu ([Stefanis et al., 2019](#)). L'autophagie médiée par les chaperonnes serait impliquée lors de l'accumulation de l'alpha-synucléine de conformation physiologique alors que la macroautophagie et la dégradation protéasomale seraient impliquées dans la clairance de l'alpha-synucléine de conformation pathologique. Ainsi, une perturbation de ces systèmes de dégradation pourrait contribuer à la pathologie. En effet, l'inactivation de TFEB participerait à l'augmentation de l'expression d'alpha-synucléine dans des neurones dopaminergiques parkinsoniens ([Decressac et al., 2013](#)).

Aussi, de manière intéressante, la maladie de Parkinson est reconnue comme une maladie « prion-like », c'est-à-dire avec des agrégats d'alpha-synucléine ayant la capacité de « contaminer » les cellules adjacentes. Cette propriété a été établie suite à l'étude post-mortem de patients parkinsoniens greffés avec des neurones fœtaux chez lesquels des corps de Lewy étaient retrouvés *a posteriori* ([Kordower et al., 2008](#)). Le mécanisme de relargage et de capture des agrégats n'est pas connu et pourrait participer à la progression de la neurodégénérescence.

Enfin, l'alpha-synucléine est également retrouvée dans la peau des patients parkinsoniens ([Rodriguez-Leyva et al., 2017](#)). Or, comme aucun test biologique n'existe pour le diagnostic de certitude de la maladie de Parkinson chez le patient vivant, certains ont proposé l'utilisation de biopsies cutanées à la recherche des formes non-phosphorylée ([Gibbons et al., 2017](#)) et phosphorylée ([Surguchov, 2016](#)) de l'alpha-synucléine.

b) La parkine

Le gène *PARK2* codant pour la parkine est responsable de près de la moitié des cas de maladie de Parkinson de transmission autosomique récessive avec début précoce. Une grande majorité des mutations de *PARK2* sont responsables d'une perte de fonction de la protéine parkine ([Konovalova et al., 2015](#)). Cette dernière est une ubiquitine ligase E3 responsable de l'ubiquitination de protéines qui sont ensuite dégradées par le protéasome. Elle assure aussi un rôle dans l'homéostasie mitochondriale (mitophagie). La perte de fonction de parkine amène à l'agrégation de protéines mal repliées et à des dysfonctions mitochondriales.

3. Lien maladie de Gaucher - maladie de Parkinson

a) Lien épidémiologique

Depuis les années 1980, de multiples observations cliniques ont rapporté la survenue de syndrome parkinsonien chez des patients souffrant de la maladie de Gaucher. Puis il a été observé chez les apparentés des patients Gaucher une proportion de maladie de Parkinson plus importante que dans la population générale ([Goker-Alpan et al., 2004](#)). En 2009, une étude multicentrique internationale (16 centres) menée sur 5691 patients Parkinson a mis en évidence 7% de porteurs d'un mutant du gène *GBA*, confirmant ainsi cette association ([Sidransky et al., 2009](#)) (Figure 26).

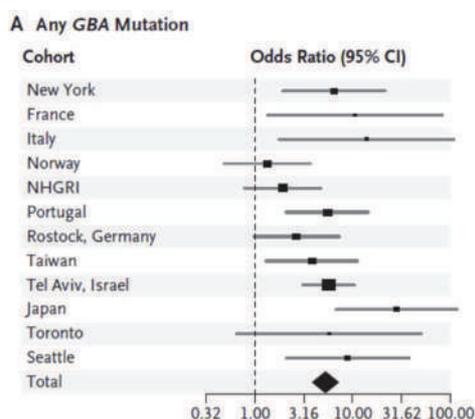


Figure 26. Risque relatif de porter une mutation *GBA* chez les patients parkinsoniens ([Sidransky et al., 2009](#)).

Aujourd'hui la présence d'un mutant *GBA*, à l'état hétérozygote ou homozygote, constitue le principal facteur de risque de développer une maladie de Parkinson avec un risque relatif supérieur à 5 ([Kalia and Lang, 2015](#)). Les patients souffrant de la maladie de Parkinson ayant des mutations de *GBA* sembleraient présenter un début plus précoce ainsi que davantage de signes neuropsychiatriques ([Chahine et al., 2013](#)).

Plusieurs mécanismes peuvent être évoqués pour expliquer le lien entre ces 2 pathologies. Le premier mécanisme repose sur le lien entre la perte de fonction de la GCCase et l'augmentation de l'expression de l'alpha-synucléine.

b) Alpha-synucléine

Dans différents modèles cellulaires où l'activité de la GCCase est déficitaire, l'augmentation de GlcCer et de GlcSph est associée à une augmentation de l'expression de l'alpha-synucléine ([Mazzulli et al., 2011](#); [Sun et al., 2015](#)). Le GlcCer qui s'accumule secondairement favoriserait la transition de l'alpha-synucléine vers la conformation amyloïde. De plus, la surexpression d'alpha-synucléine semblerait inhiber le transport de la GCCase du RE vers le lysosome, accentuant le déficit fonctionnel en GCCase ([Mazzulli et al., 2011](#)) créant ainsi un cercle vicieux. Une altération de la dégradation protéique lysosomale est également observée ainsi que de la neurotoxicité ([Sun et al., 2015](#)).

Cependant, certaines études montrent l'absence de lien entre la perte de l'activité catalytique (par l'inhibition pharmacologique par CBE) et l'expression d'alpha-synucléine dans des modèles cellulaires de neuroblastome (SH-SY5Y) et dans une lignée primaire de neurones de rat ([Cullen et al., 2011](#); [Dermentzaki et al., 2013](#); [Zurbruegg et al., 2019](#)). Seule l'inhibition génétique par un siARN dirigé contre le gène *GBA* générerait une augmentation de l'expression de l'alpha-synucléine, un effet qui peut être corrigé par l'ERT (Velaglucerase alfa, Vpriv[®]) ([Zurbruegg et al., 2019](#)). Ces travaux suggèrent que l'expression de l'alpha-synucléine serait liée au niveau d'expression de la GCCase mutée et non pas à son niveau d'activité catalytique. Cette hypothèse est renforcée par le fait que même les porteurs de mutations du gène *GBA* à l'état hétérozygote sont plus à risque de développer la maladie de Parkinson.

L'augmentation de l'expression d'alpha-synucléine est reproduite dans un modèle neuronal parkinsonien hétérozygote pour le mutant *GBA* p.N409S qui présente un stress du RE avec UPR et une dysfonction lysosomale associés à l'augmentation du relargage de l'alpha-synucléine dans le milieu extracellulaire ([Bae et al., 2014](#); [Fernandes et al., 2016](#)). Dans des neurones obtenus par différenciation d'iPSC provenant d'un patient parkinsonien, l'interaction physique entre l'alpha-synucléine et la GCCase mutée ainsi qu'avec le GlcCer et la GlcSph accélère la formation d'agrégat. Cela a été montré également avec la P-S129 alpha-synucléine ([Taguchi et al., 2017](#)). Un travail récent montre que l'effet de la diminution de l'activité catalytique de la GCCase aurait plutôt un effet sur une agrégation pré-existante ([Henderson et al., 2020](#)). Enfin, très récemment il a été rapporté que les mutations de *GBA* déséquilibrent le ratio tétramère/monomère d'alpha-synucléine favorisant son agrégation. Dans un modèle murin de Parkinson, la transduction du gène *GBA* sauvage à J1 de vie normalise le ratio et améliore la fonction lysosomale ainsi que les signes cliniques ([Glajch et al., 2021](#)).

En somme, tous ces résultats montrent le rôle des mutations du gène *GBA* dans la constitution et/ou la propagation des agrégats d'alpha-synucléine, qui jouent un rôle dans la neurodégénérescence retrouvée dans la maladie de Parkinson (Figure 27).

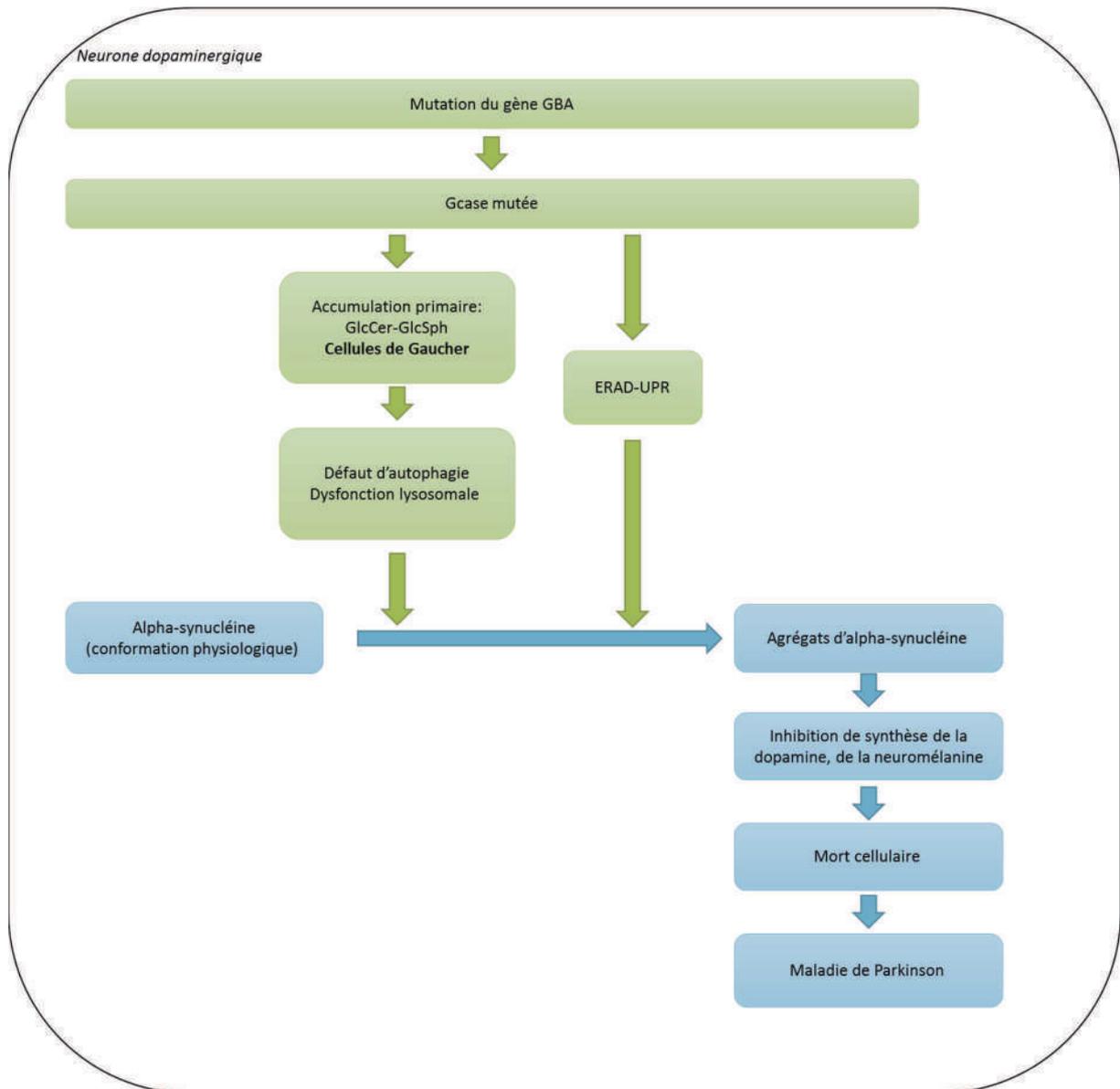


Figure 27. Hypothèses physiopathologiques reliant les mutations de *GBA* au développement de la maladie de Parkinson *via* l'alpha-synucléine.

Toutefois, les mutants *GBA* pourraient également participer à la pathogénie de la maladie de Parkinson en interagissant avec la parkine.

c) Interaction avec la parkine

Comme décrit précédemment (cf. Partie I.B.4.b), les molécules de GCases mal repliées subissent une rétention variable dans le RE mettant en route le système ERAD. La parkine, une ubiquitine ligase E3, appartient à ce système et sa perte de fonction est impliquée dans la survenue de maladie de Parkinson précoce. L'équipe d'Horowitz ([Ron et al., 2010](#)) a montré une interaction physique possible entre la parkine et la GCase mutée et sauvage mais seule la GCase mutée pourrait être dégradée par le protéasome. La liaison de la GCase mutée à la parkine conduirait à une compétition avec ses substrats naturels pouvant amener à l'accumulation secondaire des substrats de la parkine (PARIS, ARTS) pouvant entraîner l'apoptose des cellules neuronales ([Bendikov-Bar et al., 2014](#)). Enfin, la parkine favorise, en présence d'un inhibiteur du protéasome (MG132), la formation de structures « aggresome like » constituées de GCase mutée. La constitution de ces structures est une réponse cellulaire face à l'accumulation de protéines mal repliées, afin de les séquestrer et éviter une potentielle toxicité cellulaire ([Ron et al., 2010](#)). Au total, ces données suggèrent un rôle causal de la GCase mutée (mal repliée) dans la maladie de Parkinson.

Bien que cela semble paradoxal, les pathologies neurodégénératives et cancéreuses partagent des mécanismes physiopathologiques communs (Figure 28). En plus d'une association avec la maladie de Parkinson, la survenue de cancers chez les patients atteints de la maladie de Gaucher est décrite dans la littérature.

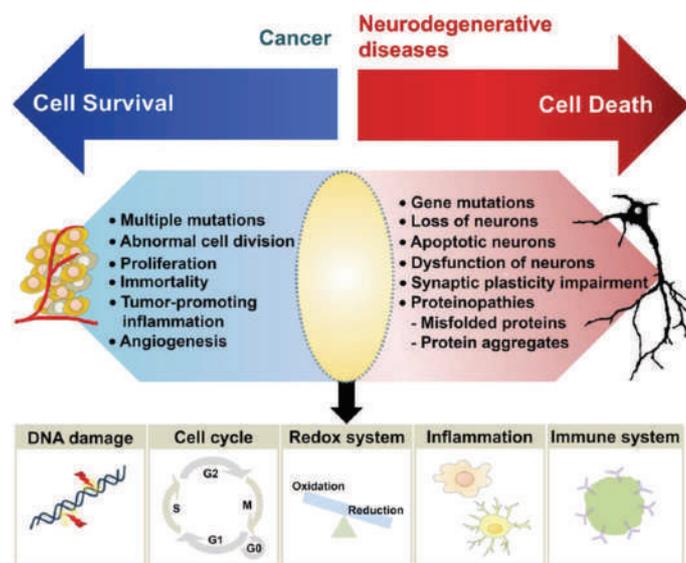


Figure 28. Mécanismes spécifiques et communs des maladies neurodégénératives et malignes (Seo and Park, 2020).

D. Cancers

À l'origine de près de 10 millions de décès en 2020, le cancer est l'une des principales causes de mortalité dans le monde (données de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)). Le taux d'incidence standardisé sur l'âge diffère selon les continents dont le taux le plus élevé est en Océanie et le plus bas en Afrique (Figure 29).

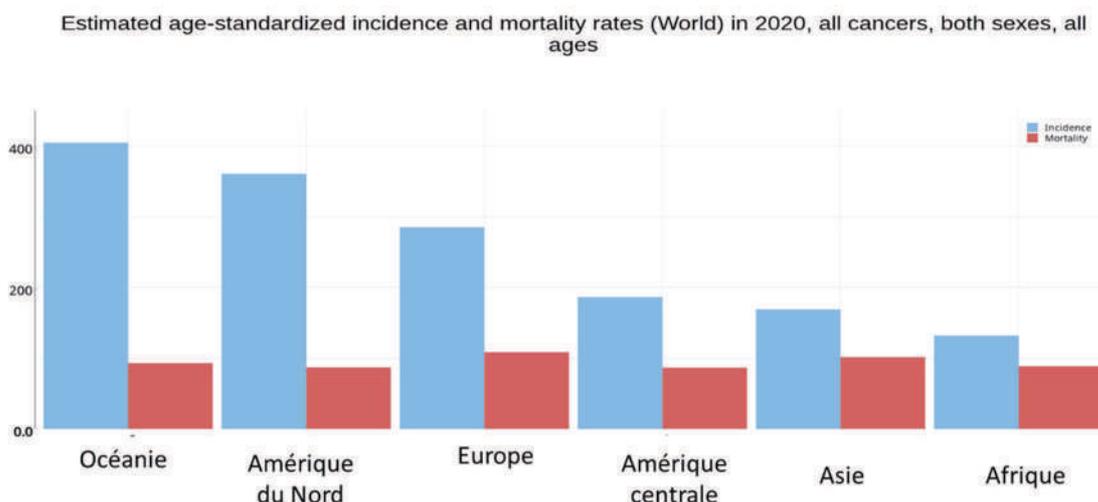


Figure 29. Taux d'incidence et de mortalité standardisés sur l'âge des cancers en 2020 dans chaque continent.

Ce graphique représente le taux d'incidence (en bleu) et le taux de mortalité (en rouge) standardisés sur l'âge des cancers pour chaque continent. Les taux sont exprimés pour 100 000 habitants. Données issues du Globocan 2020 (<https://gco.iarc.fr/>).

1. Lien épidémiologique

Ces 30 dernières années, l'association entre maladie de Gaucher et cancer a été fréquemment décrite.

En effet, plusieurs études de cas ont rapporté le développement d'hémopathies comme le myélome multiple, les gammopathies, les MGUS (*Monoclonal gammopathy of undetermined significance*), les leucémies aiguës et chroniques ainsi que le lymphome de Hodgkin ([Benjamin et al., 1979](#); [Bruckstein et al., 1980](#); [Burstein et al., 1985](#); [Chang-Lo et al., 1975](#); [Corbett et al., 1987](#); [Garfinkel et al., 1982](#)).

Outre les hémopathies, des tumeurs solides sont également décrites chez les patients Gaucher ([Arends](#)

[et al., 2013](#); [de Fost et al., 2006](#); [Murugesan et al., 2016](#); [Taddei et al., 2009](#)) y compris le mélanome dont le risque relatif est estimé entre 2,26 et 3,07 ([Landgren et al., 2007](#); [Taddei et al., 2009](#)).

Le Tableau 1 reprend toutes les études publiées cherchant à établir le risque de développer des cancers chez les patients Gaucher et montre un risque relatif variant de 0,79 à 3,6 ([Dubot et al., 2020](#)). Cette variabilité pourrait être expliquée par les différences démographiques de ces différentes cohortes (origine ethnique, âge) et la proportion des patients sous ERT. Un potentiel effet protecteur de l'ERT a été suggéré ([de Fost et al., 2008](#)) mais n'est pas fermement établi. Les patients Gaucher auraient un plus fort risque de développer des carcinomes hépatocellulaires, des myélomes multiples et des hémopathies ([Arends et al., 2013](#); [Shiran et al., 1993](#)). Parmi les 658 patients Gaucher du registre français de la maladie de Gaucher ([Stirnemann et al., 2012](#)), 27 patients avec une maladie de Gaucher type 1 présentaient au moins un cancer : 22 tumeurs solides et 10 hémopathies (Tableau 2 et Tableau 3) ([Stirnemann, 2019](#)). Dans le groupe de patients avec cancer, 59% étaient sous ERT indiquant que la correction du déficit enzymatique ne réduirait pas le risque de survenue des pathologies malignes. A noter que 5 patients ont présenté un autre cancer, ce qui a déjà été rapporté, soit après splénectomie, soit sous ERT ([Landgren et al., 2007](#); [Lo et al., 2010](#); [Taddei et al., 2009](#)). Ces observations suggèrent que la maladie de Gaucher pourrait être une condition prédisposante au cancer.

Tableau 1. Susceptibilité des patients Gaucher à développer un cancer (Dubot et al., 2020).

CI, confidence intervals; ND, not described.

CI, confidence intervals; ND, not described. Type of population	Number of patients	Age of patients (years)	Incidence and type of cancer, and relative risk for the indicated malignancy (in brackets, 95% CI)	Overall relative risk for cancer (in brackets, 95% CI)	Reference
Ashkenazi Jewish (Israel)	48	54 ± 20	Patients with any cancer : 20.8% Mean age at cancer diagnosis : 57 ± 18 RR for hematologic cancers: 14.7 [5.2-41.7]	3.6 [1.7-7.5]	(Shiran et al., 1993)
Caucasian, non-Jewish (22.7%)		0-14 : 25.6% 15-44 : 47%	Patients with any cancer : 4.6% (9.1% in Ashkenazi Jewish)		
Ashkenazi (23.2%)	2742	45-54 : 12.2% 55-64 : 7.5% >65 : 7.7%	RR for myeloma: 5.9 [2.8-10.8] RR for hematologic cancers: 1.23 [0.73-1.90]	0.79 [0.67- 0.94]	(Rosenbloom et al., 2005)
Ashkenazi Jewish	505	Males: 38.7 ± 21 Females: 37 ± 21	Patients with any cancer : 4.0%	Males: 0.6 [0.12-1.1] Females: 1.4 [0.7-2.2]	(Zimran et al., 2005)
Mostly non-Ashkenazi Jewish (Netherlands and Germany)	131	50 ± 14	Patients with any cancer : 10.7% Median age at cancer diagnosis : 52 RR for hematologic cancers: 12.7 [2.6-37.0] RR for myeloma: 51.1 [6.2-184] RR for liver carcinoma: 141.3 [17.1- 510.5]	2.5 [1.1-4.7]	(de Fost et al., 2006)
US male veterans (African Americans: 11.7%)	1525	African Americans: 46.0 Whites: 49.7	Patients with any cancer : 9% RR for non-Hodgkin lymphoma: 2.54 [1.32-4.88] RR for melanoma: 3.07 [1.28-7.38] RR for pancreatic cancer: 2.37 [1.13-4.98]	0.91 [0.76-1.08]	(Landgren et al., 2007)
Mostly Jewish	403	44 (for homozygous N370S patients)	Patients with any cancer : 12.5% RR for myeloma: 25 [9.17-54.4] RR for other hematologic cancers: 3.45 [1.49-6.79] RR for breast cancer: 1.84 [0.84- 3.49]	1.80 [1.32-2.40]	(Taddei et al., 2009)

		RR for melanoma: 2.26 [0.62- 5.79]	
		0-17 : 9.4%	
		18-24 : 4.4%	
		25-34 : 11.4%	
		35-44 : 20.6%	
		45-54 : 12.4%	
		55-64 : 16.0%	
		65-74 : 14.6%	
		>75 : 11.2%	
Mostly Jewish (Israel)	500	Patients with any cancer : 22.2%	(Jaffe et al., 2019)
		Patients with myeloma : 1%	
			ND
Caucasian (France)	658	Patients with any cancer : 4.1%	Stirnemann (unpublished)
		Patients with hematologic cancers: 1.5%	
			ND

Tableau 2. Caractéristiques des patients Gaucher ayant développé un (ou plusieurs) cancer (Dubot et al., 2020).

Données issues du registre français de la maladie de Gaucher (GD) représentant 658 patients.

		Number of patients studied
GD patients included		27
Median age of first symptoms (years)	35 (6 – 64)	14
Median time of follow-up of GD (years)	31.3 (5.3 – 74.3)	27
Female patients (%)	70	27
Patients with additional case among relatives	9	27
Gaucher type 1	27	27
Patients without genotype	7	27
Patients with full genotype	17	27
N370S/N370S	2	20
L444P/L444P	0	20
L444P/N370S	4	20
N370S/other	9	20
L444P/other	0	20
Patients with splenectomy	12	27
Patients with >1 bone event	18	26
Patients previously treated prior to inclusion	16	27
Treatment duration (years)	1 (0.1-7.3)	16
Imiglucerase	12	16
Velaglucerase	1	16
Alglucerase	2	16
Miglustat	1	16

Tableau 3. Caractéristiques des cancers développés par les patients Gaucher (Dubot et al., 2020).

Données issues du registre français de la maladie de Gaucher (GD) représentant 658 patients. NA, not available.

Patient	First cancer	Age at first cancer (years)	Second cancer	Age at second cancer (years)	Age at diagnosis of GD (years)	Age at splenectomy (years)	GD	First treatment of GD	Age at first treatment (years)	Age of death (years)
1	Basal cell carcinoma (skin)	67.3		6.3	6.3	6.3	Alglucerase	Alglucerase	53.3	73.9
2	Cholangiocarcinoma	72.0		9.0	18.0	18.0	Alglucerase	Alglucerase	48.5	
3	Smoldering myeloma	67.7		33.7	NA	NA	Imiglucerase	Imiglucerase	51.7	
4	Endometrial carcinoma	62.6	Angioimmunoblastic T cell lymphoma	83.0	61.6	NA	Miglustat	Miglustat	79.0	83.4
5	Retractory (myelodysplastic disease) anemia	49.4		28.7	29.7	29.7	Imiglucerase	Imiglucerase	50.3	68.9
6	Thyroid cancer	34.2	Lymphoma	56.8	0.0	31.2	Imiglucerase	Imiglucerase	45.7	56.8
7	Lung adenocarcinoma	62.3		45.4	NA	NA	Imiglucerase	Imiglucerase	50.7	
8	intraductal breast cancer	NA		63.6	NA	NA	none			
9	Ductal breast cancer	42.0		33.5	NA	NA	Imiglucerase	Imiglucerase	43.4	
10	Basal cell carcinoma (skin)	NA		53.7	NA	NA	Imiglucerase	Imiglucerase	54.2	
11	Malt lymphoma	47.9	Thyroid carcinoma	62.3	24.3	24.3	Imiglucerase	Imiglucerase	51.3	
12	Chronic lymphocytic leukemia	61.2	Endometrial carcinoma	62.2	56.9	61.7	none	none		67.1
13	Thyroid cancer	31.7		25.7	NA	NA	none	none		
14	Essential thrombocytemia mutated	65.9	JAK2-		11.9	15.9	Imiglucerase	Imiglucerase	59.5	
15	Lung cancer	57.2		42.4	NA	NA	none	none		57.7
16	Squamous cell carcinoma (skin)	80.3	Lung adenocarcinoma	85.7	59.8	NA	none	none		
17	Malt Lymphoma	65.8		34.1	NA	NA	Velaglucerase	Velaglucerase	64.6	
18	Bladder cancer	70.9		29.9	29.9	29.9	Imiglucerase	Imiglucerase	70.9	
19	Colonic cancer			44.4	NA	NA	none	none		

20	Prostate cancer	65.0	57.0	NA	Imiglucerase	74.0	76.9
21	Osteosarcoma	58.2	34.2	34.2	none		69.2
22	Multiple myeloma	71.5	62.4	no	none		
23	Lung squamous cell carcinoma	67.8	36.2	36.2	Imiglucerase	64.7	68.2
24	Metastatic ovarian cancer	72.2	67.4	67.6	Imiglucerase	67.5	
25	Adenocarcinoma	31.9	53.1	53.1	none		
26	Myeloma	84.8	46.0	no	none		
27	Skin carcinoma	72.1	72.1	no	none		

Les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore bien connus mais l'environnement inflammatoire et le défaut d'autophagie pourraient contribuer à ce lien.

2. Inflammation chronique et dérégulation immunitaire

La présence d'une inflammation chronique contribue à l'émergence de pathologies malignes ([Singh et al., 2019](#)). Une inflammation chronique ainsi qu'une dérégulation du système immunitaire sont décrites dans la maladie de Gaucher. En effet, l'analyse du plasma de patients Gaucher a révélé une augmentation des taux de cytokines pro et anti-inflammatoires, dont l'IL-1 β , le TNF- α , l'IL-10 et l'IL-6 ([Allen et al., 1997](#); [Boven et al., 2004](#); [Jmoudiak and Futerman, 2005](#); [Lo et al., 2010](#); [Michelakakis et al., 1996](#)). L'IL-6 participe à la prolifération des lymphocytes B et son taux a été retrouvé élevé chez les patients Gaucher présentant une immunoglobuline (Ig) monoclonale ([Allen et al., 1997](#)). La production de ces cytokines pourrait être secondaire à l'activation de p38 de la voie des MAPK comme cela a été montré dans un modèle murin de Gaucher ainsi que dans des fibroblastes issus de patients Gaucher ([Kitatani et al., 2015](#)). L'administration de l'Isogomine, une molécule chaperonne de la GCase, inhibe l'activation de p38, diminue la production de TNF α et augmente la durée de vie des souris ([Kitatani et al., 2015](#)). L'isoforme p38 δ de la voie des MAPK est inhibée par le Cer (C16-céramide) provenant du « salvage pathway » (voie de recyclage de reformation du Cer à partir de la So libérée des lysosomes (

Figure 5)). Le Cer produit active la protéine phosphatase CAPP (*ceramide-activated protein phosphatase*) qui déphosphoryle p38 ([Kitatani et al., 2006](#)). Or, la GCase intervient dans cette production de Cer *via* le « salvage pathway » ([Kitatani et al., 2009b](#)) et l'inhibition génétique de *GBA* dans les cellules de cancer du sein MCF7 induit l'induction de p38 et la production d'IL6 ([Kitatani et al., 2009a](#)). Ainsi, la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF α pourrait provenir d'un défaut de production de Cer, considéré comme un anti-oncométabolite ([Ogretmen, 2018](#)) (cf. Partie II.E.1), et participer à la cancérogenèse ([Balkwill, 2006](#); [Kumari et al., 2016](#)).

Les cellules de Gaucher, macrophages surchargés de GlcCer, ont un phénotype particulier dit « alternativement activé » correspondant à des macrophages de type M2, pro-tumoraux. De façon inattendue, ces cellules de Gaucher ne seraient pas à l'origine de la production des cytokines pro-inflammatoires retrouvées dans la maladie de Gaucher, ces dernières ayant des caractéristiques plutôt anti-inflammatoires avec l'expression de CD163 et IL1-Ra ([Boven et al., 2004](#)). La source des cytokines pro-inflammatoire serait plutôt les macrophages voisins des cellules de Gaucher dans la rate ([Boven et al., 2004](#)). De fait, des cellules de Gaucher atypiques exprimant des marqueurs spécifiques des macrophages associés aux tumeurs comme le CD63, CD168 et VEGF ont été décrites ([Ivanova et al., 2018](#)). Ces dernières pourraient participer au développement tumoral comme montré dans le carcinome hépatocellulaire ([Yeung et al., 2015](#)). Le GlcCer a été rapporté comme un ligand spécifique du récepteur mincle (*macrophage inducible C-type lectin*) exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes, conduisant à la production de TNF α et MIP-2 ainsi qu'à l'activation de molécules de costimulation immunitaire ([Nagata et al., 2017](#)). De plus, l'administration sous-cutanée de GlcSph à des souris C57BL/6JRj provoque une splénomégalie avec une infiltration splénique de macrophages M2 et l'augmentation du taux plasmatique de TNF α ([Lukas et al., 2017](#)). Au total, ces résultats suggèrent que l'accumulation de GlcCer/GlcSph pourrait participer au développement et à l'entretien d'un état inflammatoire chronique.

De plus, l'activation des lymphocytes B indépendante des lymphocytes T a été rapportée chez les patients Gaucher et serait secondaire à l'activation des lymphocytes NKT de type II contre le GlcCer et la GlcSph ([Nair et al., 2015](#)). Les Igs monoclonales retrouvées chez les patients Gaucher et dans les modèles murins montre une réactivité contre le GlcCer et la GlcSph ([Nair et al., 2015](#); [Nair et al., 2016](#); [Nair et al., 2018](#)). Aussi, le taux des IgG anti-GlcSph était réduit dans les souris traitées par l'éliglustat (SRT) comparé aux souris non traitées ([Nair et al., 2015](#)). De plus, le couple GlcCer-IgG anti-GlcCer forme un complexe immun activant la voie du complément, stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires. De façon intéressante, l'activation du complément augmente aussi l'expression du

gène *UGCG* codant pour la GCS, aggravant l'accumulation de GlcCer et créant ainsi un cercle vicieux ([Pandey et al., 2017](#)). Dans un modèle conditionnel murin de Gaucher (Mx1-Cre-loxP) où la GCCase est déficitaire dans les cellules hématopoïétiques, le développement de pathologies lymphoprolifératives B a été observé ([Pavlova et al., 2013](#)). L'accumulation de GlcCer et de GlcSph retrouvée était associée à une altération de l'immunité humorale avec la production d'IgG monoclonales ([Pavlova et al., 2013](#)). Une infiltration splénique par les lymphocytes B entourant les cellules de Gaucher a aussi été observée, suggérant une possible influence du GlcCer/GlcSph sur ces lymphocytes B ([Pavlova et al., 2013](#)). En effet, le développement tumoral était absent quand les souris étaient traitées par éliglustat très précocement, ou retardé quand le traitement était instauré plus tardivement ([Pavlova et al., 2015](#)). Dans un autre modèle murin conditionnel similaire de Gaucher, une altération du développement thymique des lymphocytes T a été observée avec une activation des lymphocytes B et un recrutement des macrophages et cellules dendritiques dans les organes lymphoïdes secondaires ([Liu et al., 2012](#); [Mistry et al., 2010](#)). Tous ces résultats pointent le rôle de la surcharge en SLs dans la dérégulation immunitaire et dans l'inflammation favorisant probablement le processus tumoral. Cependant, dans un autre modèle murin de Gaucher ($Gba^{L444P/L444P} Ugcg^{+/+}$), une inflammation systémique avec développement d'une lymphoprolifération B a été observée alors que la surcharge en GlcCer restait minime ([Mizukami et al., 2002](#)). Par ailleurs, de façon très surprenante, la GlcSph a été étudiée comme un potentiel anti-cancéreux avec des effets cytotoxiques sur les cellules de leucémie aiguë myéloblastique et une diminution de la croissance tumorale ([Angka et al., 2014](#)). Ces observations suggèrent l'existence d'autres mécanismes sous-jacents. Par exemple, l'autophagie, altérée dans la maladie de Gaucher, pourrait participer à la survenue de pathologies malignes.

3. Autophagie et réponse UPR

Comme vu précédemment, la surcharge lipidique secondaire au déficit en GCCase pourrait altérer l'autophagie *via* l'activation de mTOR, principal inhibiteur de l'autophagie, et *via* l'inactivation de TFEB. Bien que l'autophagie puisse être associée à la progression tumorale, l'altération de celle-ci peut

également contribuer au développement tumoral ([Singh et al., 2018](#)). En effet, le défaut d'autophagie entraîne un dysfonctionnement mitochondrial et la formation d'espèces réactives de l'oxygène pouvant participer à la tumorigenèse ([Galluzzi et al., 2016](#); [Park et al., 2016](#)). Dans le mélanome cutané, l'inactivation de TFEB a été retrouvée et induirait la production de TGF β qui favorise la transition épithélio-mésenchymateuse permettant aux cellules de mélanome d'acquérir des propriétés invasives et de résistance aux traitements ([Li et al., 2019](#)). Enfin, l'activation de mTOR, qui participe à la synthèse protéique et à la prolifération cellulaire ([Magnuson et al., 2012](#)), a été souvent associée au développement de cancers, dont le mélanome ; cette activation est corrélée à un mauvais pronostic ([Pópulo et al., 2011](#)). Enfin, les mutants GCCase peuvent déclencher la réponse UPR qui peut également participer au développement tumoral en favorisant l'angiogenèse, la survie et l'invasion ([Cubillos-Ruiz et al., 2017](#)).

4. Résistance aux traitements

Dans la maladie de Gaucher, l'activation du complément pourrait avoir un rôle dans la résistance en surexprimant le gène *UGCG* ([Pandey et al., 2017](#)). En effet, cette surexpression est retrouvée dans de nombreux cancers et est corrélée à l'expression de la protéine MDR1 (*multidrug resistance protein 1*) qui est une protéine membranaire permettant l'efflux des drogues notamment anti-cancéreuses. Ainsi, la surexpression de *UGCG* retrouvée chez les patients Gaucher, pourrait contribuer à la résistance aux traitements ([Wegner et al., 2018](#)).

Ainsi, toutes ces données suggèrent un possible rôle de la GCCase dans la survenue de pathologies malignes. Notre travail expérimental s'est focalisé sur ce rôle de la GCCase dans le mélanome.

II. Le mélanome

A. Epidémiologie

Le mélanome est le cancer cutané le plus agressif en raison de son fort potentiel métastatique. Bien qu'il représente moins de 5% des cancers cutanés, il reste la première cause de mortalité relative aux cancers cutanés ([Gershenwald and Guy, 2016](#)) et, est l'un des cancers les plus fréquents au monde (Figure 30). En France, l'Institut National du Cancer (INCa) a dénombré 15 500 nouveaux cas en France en 2018 et l'OMS a dénombré 16 449 cas en 2020. L'âge médian au diagnostic est de 60 ans chez la femme et de 66 ans chez l'homme ([INCA, 2021](#)).

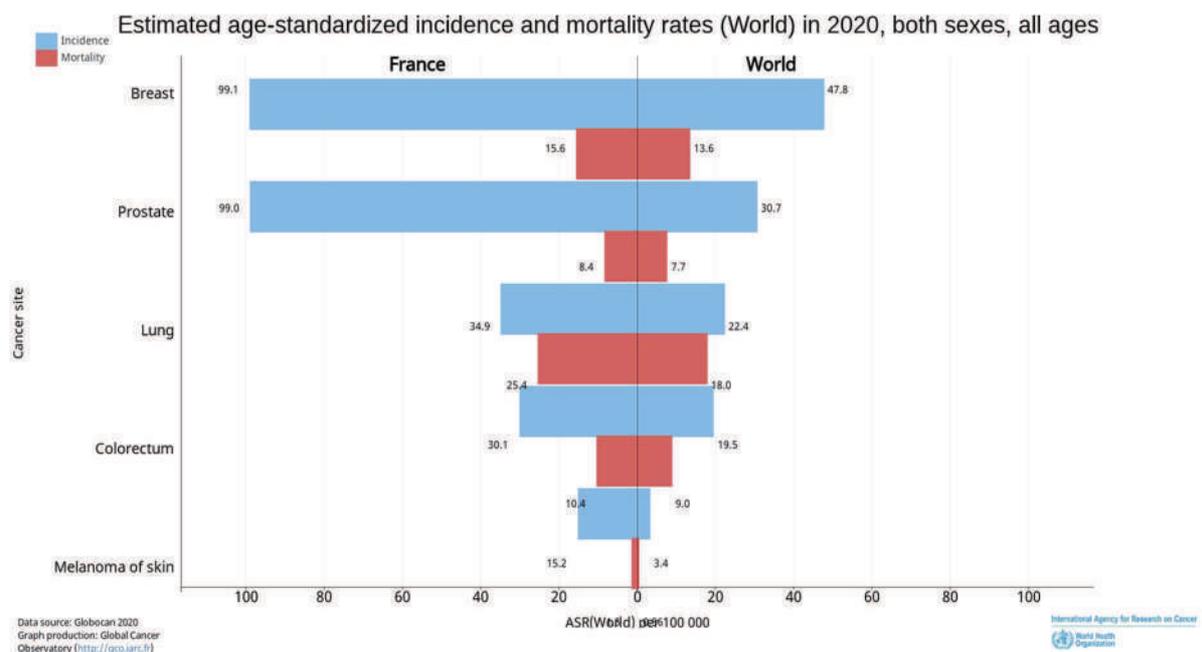


Figure 30. Taux d'incidence et de mortalité standardisés sur l'âge des principaux cancers en 2020.

Ce graphique représente le taux d'incidence (en bleu) et le taux de mortalité (en rouge) standardisés sur l'âge en France et dans le monde des 5 cancers les plus fréquents. Les taux sont exprimés pour 100 000 habitants. Données issues du Globocan 2020 (<https://gco.iarc.fr/>).

Le mélanome était un cancer relativement peu fréquent au début du 20ème siècle, mais depuis les années 1960, une augmentation de l'incidence est observée notamment chez les sujets à peau claire (+ 3.4% chez les hommes entre 2010 et 2018) ([INCA, 2021](#)). Cette augmentation pourrait être

expliquée par un meilleur dépistage clinique mais serait aussi la conséquence d'une exposition au soleil plus importante au cours des 50 dernières années. Ainsi, le mélanome cutané constitue un réel enjeu de santé publique.

B. Le mélanocyte

Les mélanocytes ont pour origine les crêtes neurales. Après la fermeture du tube neural, les mélanoblastes, précurseurs des mélanocytes, migrent vers différentes régions du corps notamment dans certains organes sensoriels (rétine, oreille interne et système nerveux central) ([Bonaventure et al., 2013](#)). Dans la peau, les mélanocytes sont des cellules dendritiques, dont le corps cellulaire est situé dans la couche basale entre les kératinocytes basaux (avec un rapport d'un mélanocyte pour 36 kératinocytes basaux) ([Seiberg, 2001](#)) (Figure 31).

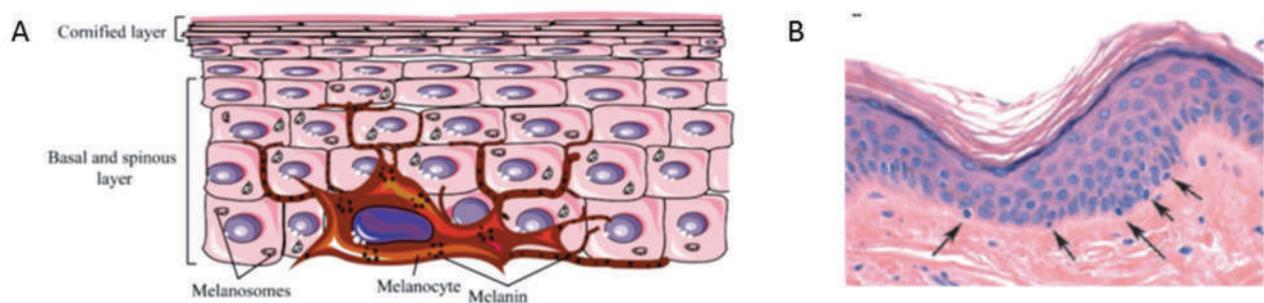


Figure 31. Le mélanocyte.

A. Localisation des mélanocytes dans la couche basale de l'épiderme, qui produisent de la mélanine dans les mélanosomes qui sont ensuite transférés aux kératinocytes adjacents ([D'Mello et al., 2016](#)). B. Coupe histologique d'une peau saine après coloration hématoxyline et éosine. Les mélanocytes sont indiqués par les flèches, à la jonction avec le derme coloré en rose. Par rapport aux kératinocytes, les mélanocytes ont de plus petits noyaux (colorés en bleu) et un cytoplasme peu distinguable ([Lin and Fisher, 2007](#)).

Les principales fonctions des mélanocytes sont la synthèse, le stockage et le transport de mélanine aux kératinocytes.

1. La mélanogenèse

La mélanine, par ses propriétés optiques, peut absorber les rayons dont la longueur d'onde s'étend des UV jusqu'au domaine du visible permettant ainsi la protection de l'ADN des kératinocytes des effets mutagènes des rayons UV. Ainsi, la pigmentation de la peau est le principal mécanisme de photoprotection ([Anderson and Parrish, 1981](#)). Deux types de mélanines sont synthétisées : les phéomélanines, pigment jaune-rouge, et les eumélanines, pigment brun-noir ([Thody et al., 1991](#)). A noter aussi l'existence de la neuromélanine, un pigment noir retrouvé dans les neurones dopaminergiques du locus niger (cf. Partie I.C.1).

La synthèse des mélanines débute par l'hydroxylation de la tyrosine en DOPA suivie par l'oxydation de la DOPA en dopaquinone par la tyrosinase. La présence de cystéine dans l'environnement détermine la suite de la synthèse. En présence de cystéine, la réaction se poursuit vers la production de phéomélanine. En l'absence de cystéine, l'eumélanine est produite sous l'action de 2 enzymes : TRP2 (*Tyrosinase Related Protein 2* ou *DCT : DOPACHrome Tautomerase*) et TRP1 (*Tyrosinase Related Protein 1*) ([D'Mello et al., 2016](#)) (Figure 32). La tyrosinase est l'enzyme limitante de la mélanogenèse ; les mutations de cette enzyme sont à l'origine de certaines formes d'albinisme, caractérisées par une dépigmentation de la peau. L'eumélanine présente un pouvoir photoprotecteur 1000 fois supérieur à celui de la phéomélanine qui est, quant à elle, considérée comme carcinogène.

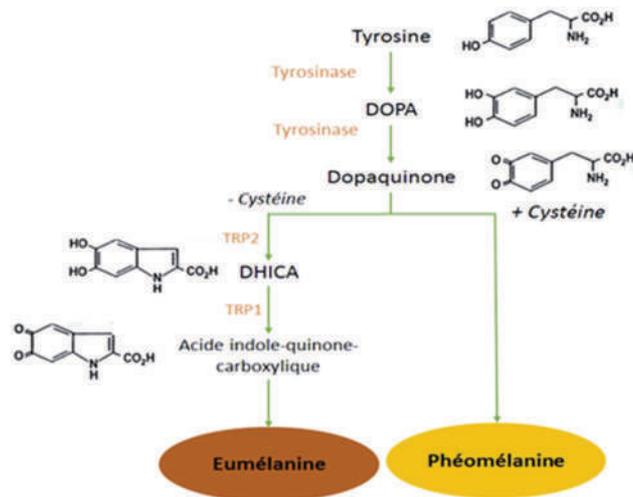


Figure 32. La mélanogénèse.

Afin de protéger le mélanocyte des résidus oxydés (quinone) produits lors de la synthèse de la mélanine, la synthèse et le stockage des mélanines ont lieu dans les mélanosomes, appartenant à la famille des LRO.

Pour assurer leur fonction de protection, les mélanosomes doivent être matures. Quatre stades de maturation sont décrits. Les stades I et II correspondent à la synthèse de l'organite, qui contient la tyrosinase non active, le stade III à la synthèse des mélanines après activation de la tyrosinase et le stade IV à un mélanosome complètement mélanisé où la tyrosinase n'est plus active ([Schiaffino, 2010](#)). Dans le mélanosome, la mélanine formée est déposée sur un réseau fibrillaire constitué principalement de la protéine Pmel17 ([Berson et al., 2001](#)). Enfin, le mélanosome migre vers les expansions cytoplasmiques du mélanocyte pour être transféré aux kératinocytes et ainsi assurer la pigmentation de l'épiderme. Les mécanismes impliqués dans ce transfert sont encore mal précisés. Le récepteur kératinocytaire PAR-2 (*protease-activated receptor-2*) pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la phagocytose des mélanosomes par les kératinocytes ([Seiberg, 2001](#)).

Les capacités de la peau à développer une pigmentation sous l'effet des rayons UV régissent le phénotype cutané. Six phénotypes cutanés sont ainsi décrits selon la composition des mélanosomes en eumélanine ou en phéomélanine et en fonction de leur répartition dans l'épiderme, cela pouvant être prédéterminé par des variations génétiques (dans le gène *MC1R* par exemple). Le phototype cutané ne dépend pas du nombre de mélanocytes, qui est identique entre les individus.

2. Le facteur de transcription MITF

Les UV sont les principaux régulateurs de la mélanogénèse. Les lésions de l'ADN des kératinocytes engendrées par les UV activent p53 qui stimule la transcription de *POMC* (gène de la Pro-OpiomélanoCortine, dont la protéolyse génère plusieurs peptides bioactifs et plus particulièrement l' α -MSH (*Melanocyte Stimulating Hormone*)) (Cui et al., 2007; Lo and Fisher, 2014). La liaison de l' α -MSH au récepteur couplé à la protéine G, *MC1R* (*Melanocortin 1 receptor*), sur les mélanocytes induit l'augmentation de l'AMP cyclique intracellulaire, qui via l'activation de la PKA (*protéine kinase A*) et de CREB (*cAMP- Responsive Element Binding protein*), stimule la transcription du gène *MITF* (Bertolotto et al., 1998a) (Figure 33). La synthèse du facteur de transcription MITF permet la transcription des gènes mélanogéniques comme *TYR* et *TRP1* ainsi que des gènes impliqués dans la synthèse des mélanosomes comme *PMEL* (Bertolotto et al., 1998b; Du et al., 2003).

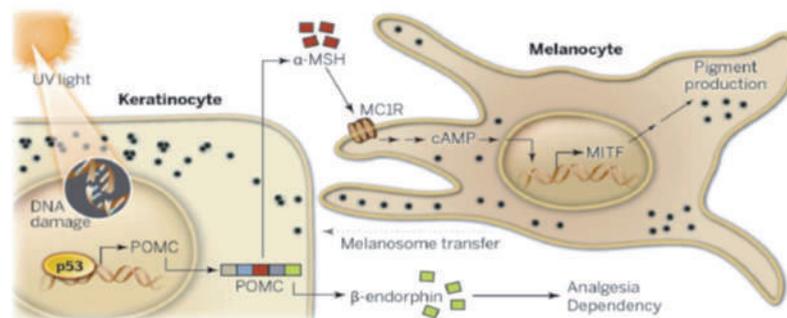
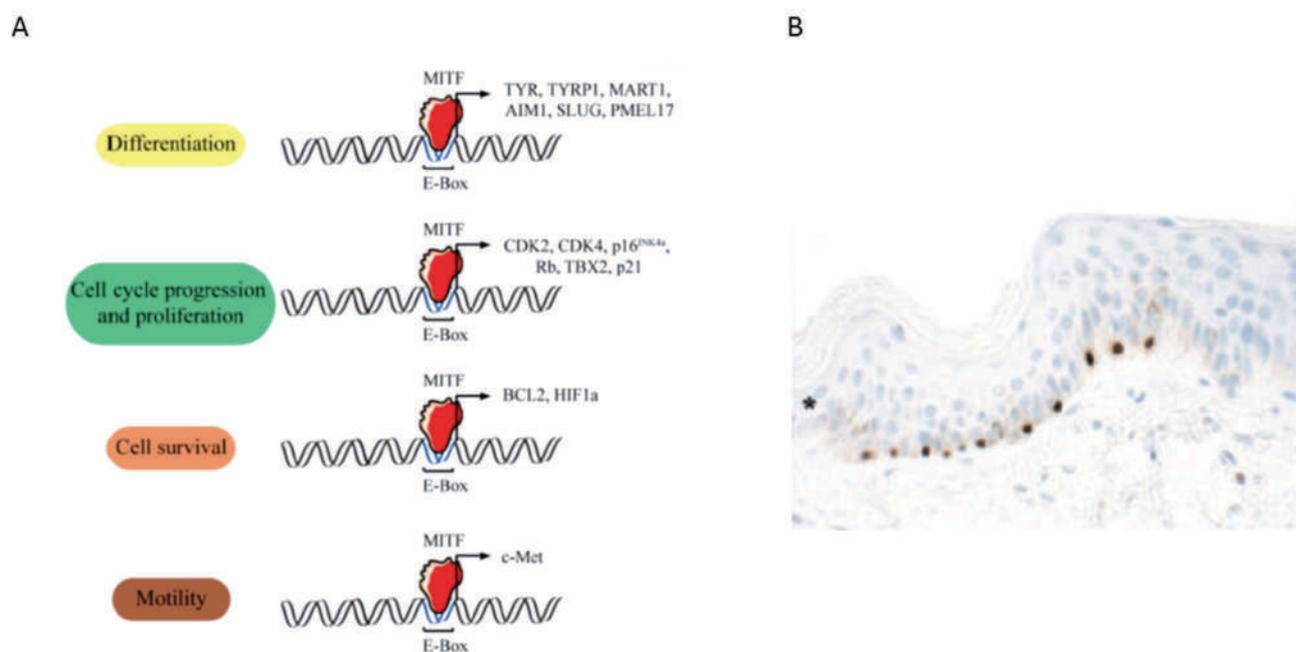


Figure 33. La régulation de la mélanogénèse par les UV.

Ce schéma illustre la réponse de la peau à l'action des UV. Les dommages de l'ADN secondaires aux UV entraînent la production de POMC suite à l'action de p53, qui après clivage produit l' α -MSH à l'origine de la production de mélanine et le β -endorphine pouvant induire une dépendance à l'exposition au soleil (Lo and Fisher, 2014).

MITF est considéré comme le *master gene regulator* de la lignée mélanocytaire. Il régule la différenciation, la prolifération et la survie mélanocytaire, la mélanogenèse et le métabolisme des mélanocytes (Figure 34). Sa régulation dépend de multiples facteurs de transcription répresseurs ou activateurs comme par exemple la voie AMPc/PKA/CREB citée ci-dessus ([Kawakami and Fisher, 2017](#)). MITF est un facteur de transcription de la même famille que TFEB (cf. Partie I.A.1.a). Il est codé par le gène *MITF* dont l'épissage alternatif est à l'origine de plusieurs isoformes tissu-spécifiques. L'isoforme M est l'isoforme retrouvée dans les mélanocytes ainsi que dans les cellules de mélanome ([Kawakami and Fisher, 2017](#)). Chez l'Homme, les mutations de type perte de fonction sont responsables du syndrome de Waardenburg de type 2a qui est caractérisé par une microphthalmie, une hypopigmentation et une surdité ([Grill et al., 2013](#)). Chez la souris, les mutations de *Mitf* sont responsables d'un phénotype similaire.



C. Initiation et progression du mélanome

Le mélanome est une maladie multifactorielle, résultant de différentes causes interagissant entre elles. Tout d'abord, l'étude histologique indique que la mélanomagenèse apparaît biphasique: une première phase où l'extension est « horizontale » intra-épidermique (ou *RGP: Radial Growth Phase*) et une seconde phase où l'extension est « verticale » (ou *VGP: Vertical Growth Phase*) envahissant le derme et l'hypoderme (phase invasive) où les cellules de mélanome peuvent atteindre la circulation sanguine (Figure 35). Une fois dans la circulation sanguine, les cellules de mélanome ont la capacité de former des métastases notamment pulmonaires ou cérébrales.

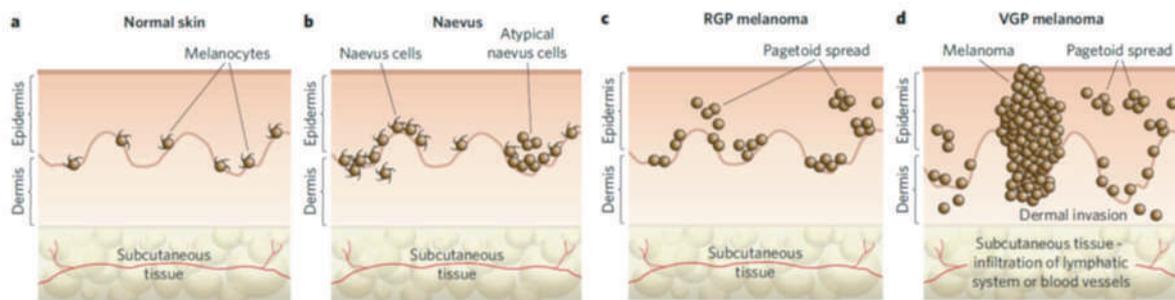


Figure 35. Les différentes phases de la mélanomagenèse (Gray-Schopfer et al., 2007).

a) Peau saine. b) Naevus: tumeur bénigne mélanocytaire. c) Mélanome à croissance horizontale (RGP). d) Mélanome à croissance verticale (VGP).

1. Mutations somatiques

Comparé aux autres tumeurs solides, le taux de mutations somatiques est exceptionnellement élevé dans le mélanome (Hill et al., 2013). Des mutations activatrices dans des oncogènes participent à la mélanomagenèse, ce qui est le cas pour les mutations de la voie des MAPK régulant la prolifération cellulaire. Des mutations de BRAF sont retrouvées dans 50% des mélanomes et la mutation p.V600E représente 75% des mutations décrites de cette kinase (Davies et al., 2002; Hill et al., 2013). D'autres mutations somatiques sont décrites dans cette voie notamment les mutations de la protéine NRAS (20% des patients), en amont de la protéine BRAF. Ces mutations entraînent l'activation constitutive de la voie MAPK et par conséquent la prolifération des mélanocytes, formant des tumeurs bénignes

(naevi). La présence de ces mutations ainsi que des mutations somatiques secondaires favoriseraient la mélanomagenèse et la progression des mélanomes.

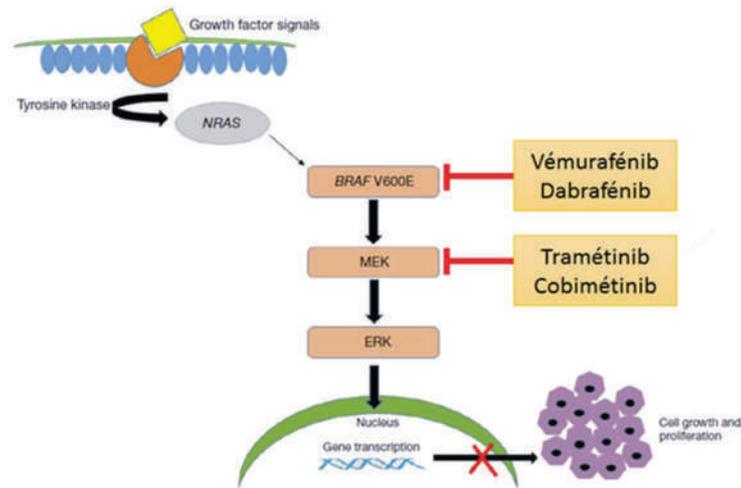


Figure 36. Illustration de l'activation de la voie MAPK dans le mélanome.

La mutation BRAF^{V600E} active la voie MAPK de façon permanente sans que la liaison du ligand sur le récepteur soit nécessaire. Cette activation est à l'origine de la croissance cellulaire. Ce schéma indique également le mode d'action de certaines thérapies ciblées (cf. Partie II.D.2.a).

En particulier, la perte de fonction d'un gène suppresseur de tumeur entraînant la sénescence induite par les oncogènes (OIS) et l'immortalisation des cellules tumorales, est nécessaire à la mélanomagenèse. Le gène le plus fréquemment impliqué est le gène *CDKN2A*, situé sur le chromosome 9p21, pour lequel des mutations sont retrouvées dans 30-40% des mélanomes familiaux. Ce gène code pour 2 protéines suppresseurs de tumeur : p16^{INK4a} et p14^{ARF}. La protéine p16^{INK4a} inhibe le complexe CDK4/cycline D et agit comme un régulateur négatif de la prolifération cellulaire en arrêtant le cycle cellulaire en phase G1. Quant à la protéine p14^{ARF}, elle intervient en inhibant la dégradation du facteur de transcription p53 par liaison à la protéine Hdm2 (ou Mdm2) entraînant ainsi l'accumulation de p53. Ces mutations provoquent la perte de fonction de ces protéines et ont pour conséquence un défaut d'inhibition du cycle cellulaire ([Read et al., 2016](#)).

Il existe cependant une variabilité de la pénétrance selon les régions géographiques reflétant une probable association des facteurs environnementaux (dont l'exposition aux UV) à ces facteurs

génétiques. La majorité des mutations somatiques retrouvées portent la « signature » des dommages de l'ADN engendrés par les UV ([Pleasant et al., 2010](#)).

2. Rôle des UV

Le rôle de l'exposition aux UV dans la mélanomagenèse est relativement bien connu du grand public. En effet, des études épidémiologiques attestent du lien entre le développement du mélanome et l'exposition intense au soleil, les coups de soleil dans l'enfance ainsi que l'utilisation de cabine UV ([Boniol et al., 2012](#); [Whiteman et al., 2001](#)). Ce risque est d'autant plus important que le phototype de la personne est clair ([Rees, 2003](#)). Les radiations UV génèrent plusieurs altérations comme la production d'espèces réactives de l'oxygène, des modifications de la réponse immunitaire, et la production de facteurs de croissance, mais la principale altération causée par les UV sont les mutations génétiques ([Lo and Fisher, 2014](#)). Ces mutations présentent une signature caractéristique des UV (désamination de la cytosine en thymine et substitution de la guanine en thymine) ([Alexandrov et al., 2013](#)). Une équipe a montré que des souris *BRAF^{V600E}* exposées aux UV présentent des nævi plus larges et en plus grand nombre par rapport aux souris mutées non exposées. De plus, toutes les souris mutées exposées ont développé un mélanome plus précocement (à 7 mois) alors que 70% des souris mutées non exposées ont développé un mélanome à 12,6 mois. L'étude génomique de ces tumeurs a révélé des altérations moléculaires différentes avec notamment dans les tumeurs exposées, les signatures moléculaires des UV dans le gène *TP53* codant pour la protéine p53. Ceci suggère que l'exposition aux UV de nævi *BRAF^{V600E}* contribue à l'induction de la mélanomagenèse en ciblant p53 ([Viros et al., 2014](#)).

3. Changement phénotypique

Les cellules de mélanome ont la capacité de changer de phénotype. Ce phénomène de reprogrammation non génétique est nommé switch phénotypique ou transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) bien que les cellules de mélanome ne soient pas des cellules épithéliales. C'est un phénomène physiologique qui se produit lors du développement embryonnaire et lors de la régénération tissulaire ([Nieto, 2013](#)). La contribution de cet évènement au processus tumoral est bien documentée ([Bakir et al., 2020](#)). Dans le mélanome, la TEM contribue au développement ([Caramel et al., 2013](#)) et à la résistance aux traitements ([Richard et al., 2016](#)). Lors de ce processus, les cellules au phénotype épithélial acquièrent un phénotype mésenchymateux donnant aux cellules tumorales des capacités migratoires, invasives, et d'échappement immunitaire. Le métabolisme de ces cellules change aussi, elles acquièrent des capacités de cellules souches et des cellules sont bloquées en sénescence ([Lu and Kang, 2019](#)). Ce phénomène est réversible, qualifiant alors la transition mésenchymato-épithéliale.

La TEM est un processus complexe influencé par de nombreux facteurs dont le TGF β et régulé dans le temps et l'espace ([Lamouille et al., 2014](#)). Dans le mélanome, le principal inducteur de la TEM est MITF. Le gène *MITF* est retrouvé amplifié dans 20% des mélanomes avec un phénotype invasif et de chimiorésistance. Le rôle de MITF dans la mélanomagenèse reste cependant controversé. Il semble que ce facteur agisse comme un rhéostat moléculaire dont le niveau d'expression conditionne le devenir cellulaire. Des mélanomes avec des taux bas de MITF sont décrits plus invasifs (métastatiques) et ceux avec des taux élevés plus prolifératifs et moins invasifs ([Kawakami and Fisher, 2017](#)). MITF pourrait moduler différents processus cellulaires comme la prolifération, la survie, la motilité et ainsi jouer un rôle oncogénique ([Ploper and De Robertis, 2015](#)).

Le gène *MITF* a également un rôle en tant que gène de prédisposition. Une large étude australo-britannique de 3940 cas de mélanome, versus 4036 contrôles, a révélé que la présence de la mutation p.E318K conférait un risque 2,19 fois plus important de développer un mélanome ([Yokoyama et al.,](#)

[2011](#)). L'analyse fonctionnelle de cette variation a montré un défaut de sumoylation de MITF, ce qui modifie son activité transcriptionnelle en faveur d'un gain de fonction tumorigène ([Bertolotto et al., 2011](#)).

De manière intéressante, une association originale entre la maladie de Parkinson, une maladie neurodégénérative et la survenue de mélanome est retrouvée. L'alpha-synucléine pourrait jouer un rôle parmi les mécanismes qui sous-tendent cette association.

4. Rôle de l'alpha-synucléine

Le risque de survenue de pathologies malignes chez les patients atteints de la maladie de Parkinson serait inférieur à la population générale à l'exception de quelques cancers dont le mélanome ([Ejma et al., 2020](#)). La prévalence du mélanome dans une cohorte américaine de 1692 patients atteints de la maladie de Parkinson était 2,24 fois plus élevée que dans la population générale ([Bertoni et al., 2010](#)). Dans une autre étude, les patients parkinsoniens avaient 2 fois plus de risque de développer un mélanome ([Olsen et al., 2005](#)). De même, des antécédents familiaux de mélanome sont retrouvés plus fréquemment chez les patients atteints de la maladie de Parkinson ([Gao et al., 2009](#)). Réciproquement, les patients atteints de mélanome ont un risque relatif de 2,07 de développer une maladie de Parkinson ([Olsen et al., 2006](#)). Le mécanisme sous-jacent de cette association reste inconnu aujourd'hui mais plusieurs possibilités sont évoquées dont le rôle de l'alpha-synucléine ([Bose et al., 2018](#); [Inzelberg et al., 2016](#)).

Les cellules neuronales dopaminergiques et les mélanocytes partagent quelques caractéristiques, probablement du fait de leur même origine embryonnaire, la crête neurale ([Pavan and Raible, 2012](#)). Ces deux types cellulaires synthétisent de la mélanine et contiennent de l'alpha-synucléine. La présence d'alpha-synucléine est également retrouvée dans différentes lignées cellulaires de mélanome, métastatique ou non, mais aussi dans les mélanocytes, alors qu'elle n'est pas retrouvée dans d'autres cancers, notamment les carcinomes épidermoïdes, ni dans la peau saine ([Matsuo and Kamitani, 2010](#)). Dans ce travail, l'analyse immunohistochimique de 32 coupes de mélanomes a

montré un marquage alpha-synucléine dans environ 85% des cas et l'analyse du co-marquage mélanine-alpha-synucléine de 17 coupes a révélé qu'une faible expression de mélanine était associée à une forte expression d'alpha-synucléine ([Matsuo and Kamitani, 2010](#)). La pigmentation pourrait être altérée par l'alpha-synucléine *via* l'inhibition de la tyrosinase ([Pan et al., 2012](#)), diminuant la synthèse de mélanine ou en facilitant l'agrégation de la protéine fibrillaire Pmel17. Cette dernière constitue le réseau fibrillaire de soutien de la mélanine dans le mélanosome (cf. Partie II.B.1). Son agrégation pourrait alors altérer le stockage et le transport des mélanosomes vers les kératinocytes et ainsi entraîner une perte de la pigmentation ([Dean and Lee, 2020](#)). De façon intéressante, la présence d'alpha-synucléine est également retrouvée dans la peau de patients parkinsoniens mais l'expression est plus faible que dans les nævi et les mélanomes ([Rodriguez-Leyva et al., 2017](#)). De plus, l'analyse récente des transcrits du gène *SNCA* (selon la base de données TCGA) a révélé une corrélation entre l'augmentation de l'expression d'alpha-synucléine et la diminution de la survie des patients atteints de mélanome ([Shekoohi et al., 2021](#)). Dans un modèle murin de la maladie de Parkinson présentant la mutation A53T de l'alpha-synucléine, l'injection de cellules de mélanome murin (B16) est associée à une augmentation de la croissance tumorale comparée aux souris non transgéniques ([Israeli et al., 2011](#)). Ce phénomène n'est pas retrouvé dans le modèle murin d'une autre pathologie neurodégénérative qui est la maladie d'Alzheimer. Dans le modèle murin de la maladie de Parkinson, l'étude histologique des mélanomes a montré la présence d'alpha-synucléine, indiquant un possible « transport/export » de l'alpha-synucléine depuis l'hôte vers la tumeur. Cela a été confirmé *in vitro* par la présence d'alpha-synucléine dans les cellules traitées par de l'alpha-synucléine exogène supportant l'effet « prion-like » de l'alpha-synucléine. Par ailleurs, la surexpression d'alpha-synucléine dans les cellules de mélanome murin (B16) entraîne une prolifération *in vitro* plus importante que dans les cellules témoins ([Israeli et al., 2011](#)) alors que la perte d'expression de l'alpha-synucléine réduit la prolifération *in vitro* et la croissance tumorale de cellules de mélanome humain (SKMEL28) dans un modèle murin immunodéficient ([Shekoohi et al., 2021](#)). Toutes ces observations suggèrent que les cellules mélanocytaires exprimant fortement l'alpha-synucléine produisent moins de mélanine et

prolifèrent davantage, pouvant contribuer au développement du mélanome avec une possible propagation de ces caractéristiques *via* l'effet prion-like de l'alpha-synucléine. De plus, la présence de P-S129-alpha-synucléine (phosphorylée sur la sérine 129) a été rapportée dans les cellules de mélanome avec une localisation subcellulaire différente de l'alpha-synucléine non phosphorylée. La S129-P-alpha-synucléine serait localisée dans le noyau, à la surface membranaire et dans le milieu extracellulaire. La phosphorylation sur ce résidu favoriserait la localisation à la membrane ainsi que l'export dans le milieu extracellulaire ([Lee et al., 2013](#)). Enfin, un défaut d'autophagie a été observé dans des cellules de mélanome humain (SKMEL28) où l'alpha-synucléine est surexprimée, ce qui pourrait participer au développement tumoral ([Nandakumar et al., 2017](#)).

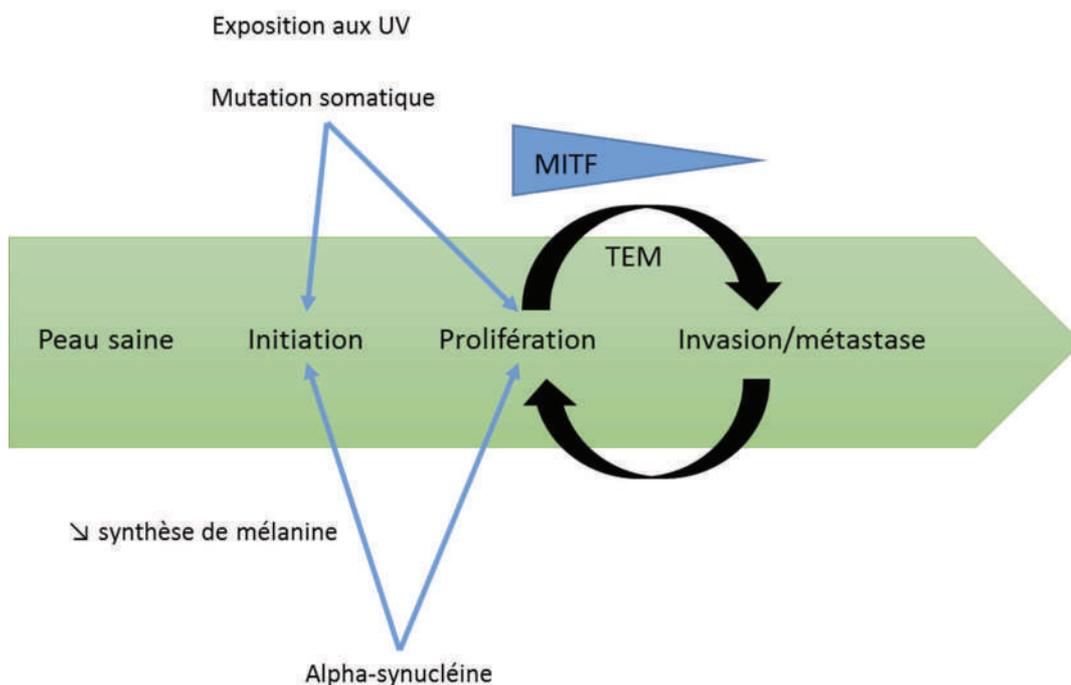


Figure 37. Schéma récapitulatif des mécanismes décrits dans ce travail au cours de la progression tumorale.

D. Prise en charge

La prise en charge du mélanome dépend du stade de ce dernier.

1. Mélanome localisé

Pour les stades localisés, la prise en charge repose sur l'exérèse tumorale avec ou non de la radiothérapie et/ou un traitement par interféron γ (Sladden et al., 2018).

2. Mélanome métastatique

Pour le mélanome métastatique, la chirurgie n'est pas suffisante et un traitement médicamenteux est nécessaire. La dacarbazine, une chimiothérapie, fut le premier traitement utilisé, mais sans réelle efficacité sur la survie globale des patients. Désormais, la place de la chimiothérapie dans la prise en charge du mélanome non résecable ou métastatique est limitée, cependant la chimiothérapie cytotoxique fait encore partie de l'arsenal thérapeutique (e-cancer.fr et sfdermato.org).

De nouvelles thérapeutiques ont été développées ces dernières années : les thérapies ciblées comprenant les inhibiteurs de la protéine BRAF mutée, et l'immunothérapie comprenant les inhibiteurs des points de contrôle immunitaire : anti-CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) et anti-PD1 (*Programmed cell Death 1*) (Figure 38).

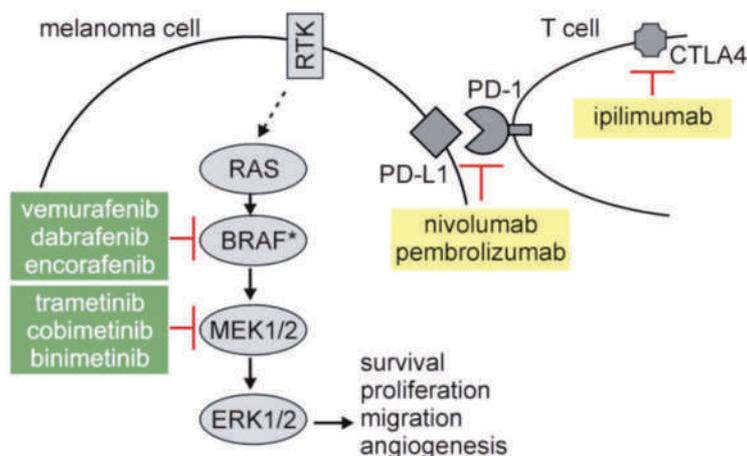


Figure 38. Cibles des thérapies ciblées et des immunothérapies (Hartman, 2020).

a) Les thérapies ciblées

Les thérapies ciblées s'adressent exclusivement aux mélanomes porteurs d'une mutation de *BRAF*^{V600}. Il existe des inhibiteurs sélectifs de BRAF muté (BRAFi) (vémurafénib (Zelboraf) et dabrafénib (Tafinlar) et encorafénib (Braftovi)) et des inhibiteurs de MEK (MEKi) (tramétinib (Mekinist), cobimétinib (Cotellic) et binimetinib (Mektovi)), une molécule en aval de BRAF (Figure 38).

Dans l'essai clinique BRIM 3, la survie sans progression des patients sous vémurafénib comparée aux patients sous dacarbazine a été augmentée (6,9 mois vs 1,6 mois) avec une amélioration de la survie globale (13,6 mois vs 9,7 mois) ([McArthur et al., 2014](#)). De même, la survie sans progression de la maladie des patients sous dabrafénib comparée aux patients sous dacarbazine est supérieure (5,1 mois vs 2,7 mois) ([Fleeman et al., 2015](#)). Néanmoins, les inhibiteurs de BRAF présentent des effets secondaires indésirables (arthralgies, fatigue, troubles digestifs, carcinome épidermoïde...) ([Puzanov et al., 2015](#)). Cette amélioration du taux de réponse ainsi que de la survie sans progression a révolutionné le pronostic du mélanome métastatique. Cependant, les réponses observées sont rarement durables et des échappements thérapeutiques surviennent dans la majorité des patients 6 à 8 mois suivant l'instauration du traitement ([Solit and Rosen, 2011](#)). Le changement de thérapie suite à un échappement sous BRAFi, par MEKi, n'a pas montré de bénéfice. Par contre, les essais cliniques COMBI-d et COMBI-v testant la combinaison BRAFi et MEKi ont révélé une amélioration de la survie globale et sans progression ainsi qu'une diminution des effets secondaires des inhibiteurs de BRAF ([Grimaldi et al., 2014](#)) ([Robert et al., 2019](#); [Robert et al., 2015a](#)). Ces essais mettent en évidence comme facteur pronostique principal le taux plasmatique de LDH qui est de mauvais pronostic si >2 fois la normale.

b) L'immunothérapie

Dans le mélanome, les lymphocytes infiltrant la tumeur expriment des récepteurs inhibiteurs PD-1 et CTLA-4 entraînant une immunosuppression promouvant ainsi la progression tumorale. Le blocage de ces points de contrôle immunitaire (*immunocheckpoint*) permet de rétablir une réponse immunitaire

anti-tumorale efficace. Ces travaux, menés par James P. Allison et Tasuku Honjo, ont reçu le prix Nobel de Physiologie-Médecine en 2018 ([Iwai et al., 2002](#); [Leach et al., 1996](#)). L'immunothérapie se compose principalement de deux classes de molécules : les anti-CTLA-4 (ipilimumab) et les anti-PD1 (nivolumab et pembrolizumab) (Figure 38).

L'ipilimumab est un anticorps monoclonal humanisé, qui bloque le CTLA-4, un régulateur négatif des lymphocytes T, exprimé par les lymphocytes T. Ce blocage a pour conséquence l'activation et la prolifération des lymphocytes T effecteurs. Les anti-PD1 sont des anticorps monoclonaux qui se lient au récepteur de mort cellulaire programmée 1 (PD1) bloquant l'interaction entre le récepteur et son ligand PD-L1 (*Programmed cell Death Ligand 1*), libérant le potentiel cytotoxique des lymphocytes T spécifiques de la tumeur. Le récepteur PD-1 régule négativement la phase effectrice de la réponse lymphocytaire T après s'être lié à son ligand PD-L1 qui est fréquemment exprimé par les cellules tumorales et certaines cellules du microenvironnement tumoral. Des essais cliniques ont montré leur efficacité par rapport à la dacarbazine ([Hodi et al., 2010](#); [Robert et al., 2015b](#)).

En conclusion, même si des progrès majeurs ont été réalisés quant à la prise en charge du mélanome métastatique, une proportion non négligeable de patients (environ 40%) ne répondent pas aux traitements proposés ou rechutent ([Luke et al., 2017](#)) (Figure 39). Une meilleure compréhension de la physiopathologie du mélanome ainsi que des mécanismes de résistance permettrait d'améliorer le pronostic et la prise en charge des patients atteints de mélanome.

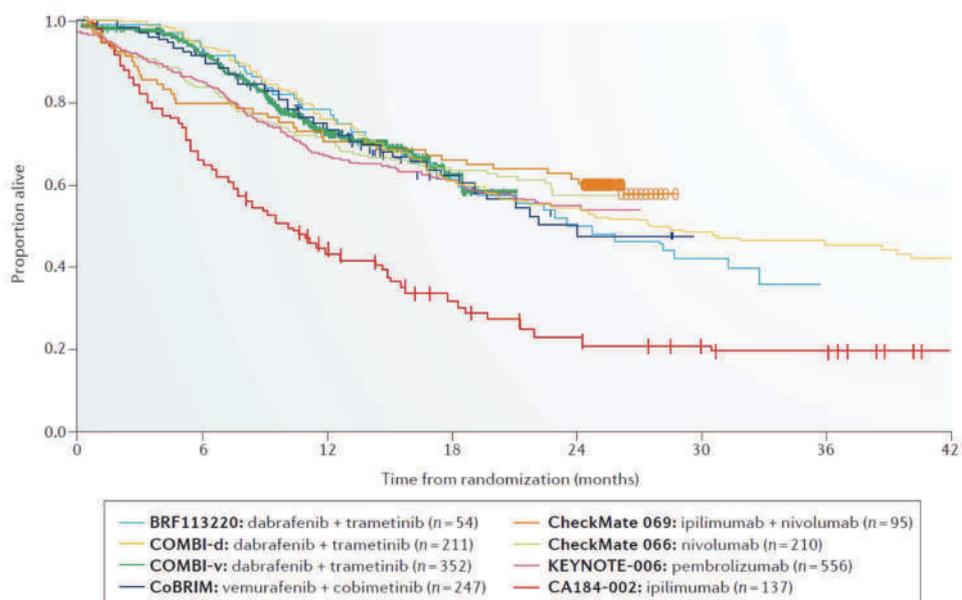


Figure 39. Courbes de survie Kaplan-Meier au cours de différents essais cliniques (Luke et al., 2017).

Les cellules de mélanome présentent différentes altérations de leur métabolisme lipidique. En particulier, des dérégulations du métabolisme des SL ont été décrites et pourraient jouer un rôle dans le développement tumoral (cf. revues de notre équipe (Carrié et al., 2020; Pellerin et al., 2020)).

E. Dérégulation du métabolisme des sphingolipides dans le mélanome

Dans les cellules de mélanome, le taux de Cer qui est considéré comme un anti-oncométabolite, est diminué au profit de la production d'un oncométabolite, la S1P (Carrié et al., 2020) (Figure 40). Cette production est liée à une augmentation de l'expression et de l'activité de la sphingosine kinase (SK1) (Albinet et al., 2014) et est associée à de nombreux processus pro-tumoraux. En particulier, la surexpression de la SK1 favorise l'immuno-échappement en promouvant le recrutement de macrophages associés à la tumeur qui ont un profil M2, permettant le recrutement de lymphocytes T régulateurs qui ont une fonction immunosuppressive (Mrad et al., 2016). Une association entre l'augmentation de l'expression de SK1 dans les tumeurs et le mauvais pronostic de patients atteints de mélanome métastatique et traités par anti PD-1 a été aussi rapportée (Imbert et al., 2020). Ainsi,

l'inhibition génétique de SK1 rétablit une immunité anti-tumorale et améliore l'effet de l'immunothérapie, à base d'anti-PD-1 et d'anti-CTLA-4, dans un modèle murin de mélanome (Imbert et al., 2020). D'autre part, il a été montré que la résistance au vémurafénib, un BRAFi, est corrélée à l'expression des récepteurs à la S1P, S1PR1 et S1PR3. L'augmentation du ratio Cer/S1P par approche génétique ou pharmacologique permet de réduire l'expression des S1PR et d'inhiber la croissance de mélanomes chez la souris (Garandeau et al., 2019). L'ensemble de ces données suggèrent que la voie SK1/S1P/S1PR pourrait être une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de mélanomes métastatiques résistants aux thérapies.

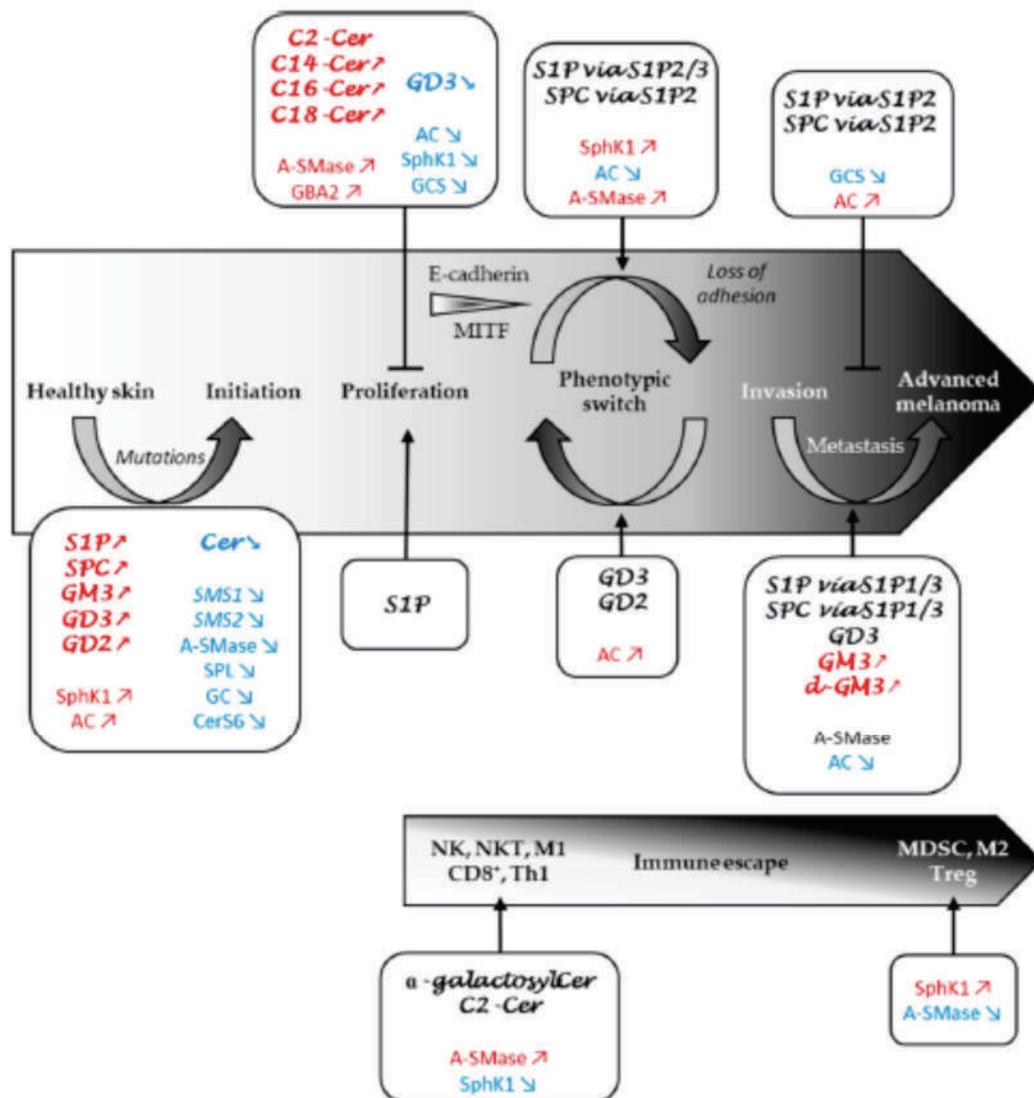


Figure 40. Altérations du métabolisme des SL décrites dans les différentes étapes du développement du mélanome (Carrié et al., 2020).

1. Le céramide : un anti-oncométabolite

En réponse à un stress cellulaire, la synthèse et/ou l'accumulation du Cer conduit à la mort cellulaire *via* différents mécanismes dont l'apoptose, la nécroptose, et l'autophagie (Figure 41) (Ogretmen, 2018).

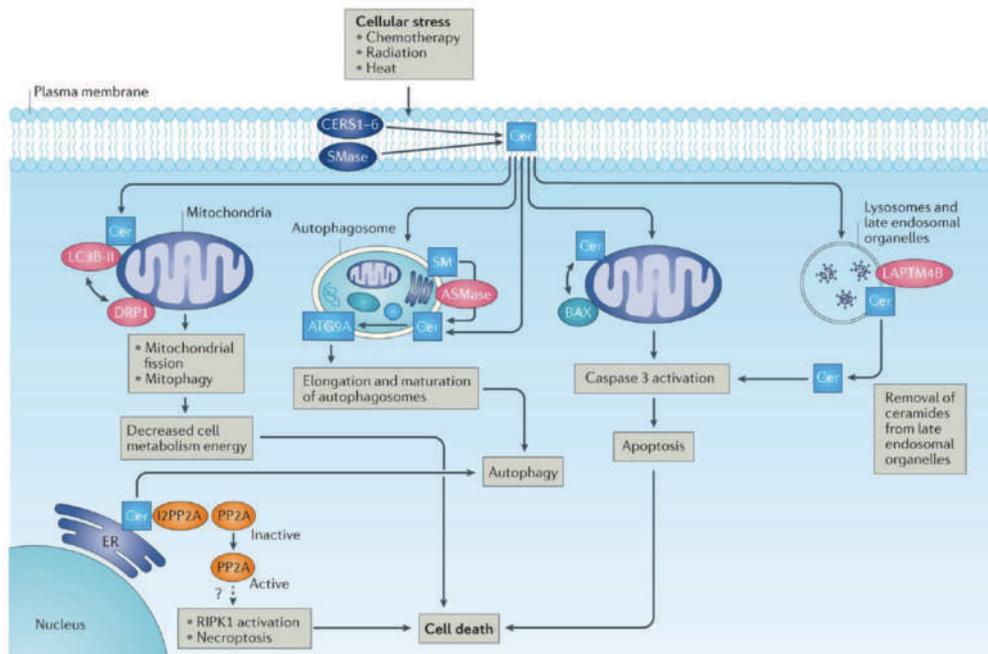


Figure 41. Rôle du céramide dans la mort cellulaire des cellules cancéreuses (Ogretmen, 2018).

En réponse à un stress cellulaire, une production accrue de Cer *via* l'activation des céramides synthases (CERS1-6) et/ou l'action de sphingomyélinases (SMases) est décrite amenant à la mort cellulaire. Plusieurs mécanismes sont ici représentés. L'accumulation de Cer dans la membrane mitochondriale induit le recrutement de BAX entraînant l'apoptose dépendante des caspases en réponse aux radiations. Cette accumulation peut également induire la mitophagie amenant à la mort cellulaire par manque de métabolisme énergétique. L'apoptose dépendante des caspases peut être aussi activée par le Cer provenant des membranes du système endo-lysosomal suite à l'action de la protéine LAMP4B (*lysosomal-associated transmembrane protein 4B*). Le Cer provenant de l'hydrolyse de la SM dans les membranes des autophagosomes active l'autophagie qui peut également être induite par le Cer provenant du stress du RE. Ce dernier pouvant induire la nécroptose.

Le Cer peut aussi induire la sénescence (Traysac et al., 2018), un autre processus adaptatif au stress au cours duquel les cellules arrêtent leur division de façon irréversible puis sont éliminées par les cellules immunitaires permettant la régénération tissulaire (Figure 42).

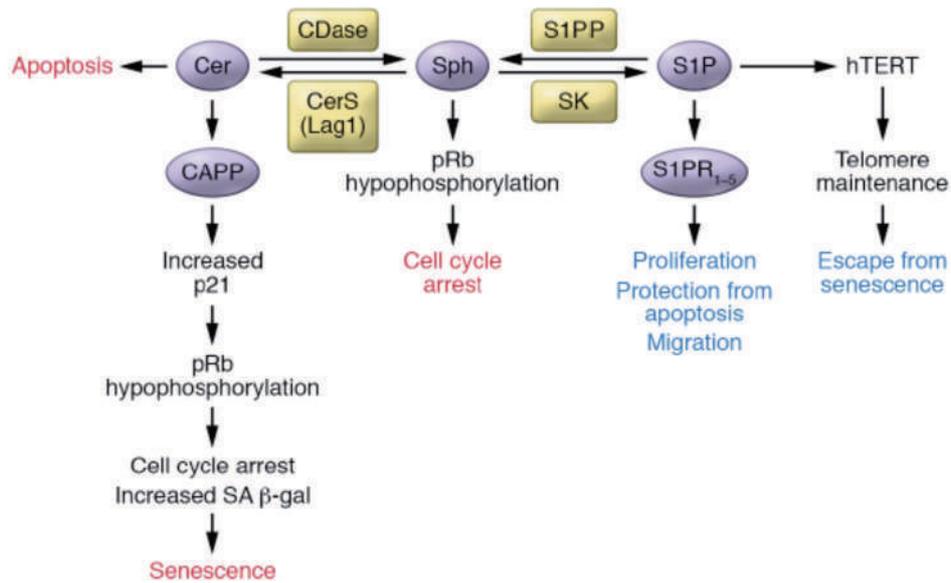


Figure 42. Rôle du céramide et de la S1P dans la sénescence (Traysac et al., 2018).

Cependant, les cellules cancéreuses modifient le métabolisme du Cer afin de réduire sa concentration intracellulaire ainsi que les effets délétères induits par celui-ci (Tableau 4: Altérations du métabolisme du céramide et effets associés dans diverses cellules cancéreuses. Tableau 4).

Tableau 4: Altérations du métabolisme du céramide et effets associés dans diverses cellules cancéreuses.

Enzyme	Function or activity	Cancer relevance	Inhibitors
<i>Ceramide synthesis and tumour suppression</i>			
SPT	De novo ceramide synthesis	Increased activity in response to chemotherapy and radiotherapy in breast cancer cells	Myriocin
CERS1	Synthesis of C18 (dihydro)ceramide	Induces mitophagy in head and neck and AML cell lines, mouse xenograft models and patient-derived AML cells	FB1; HDAC1 or HDAC2
CERS6	Synthesis of C16 (dihydro)ceramide	Induces caspase activation and cell death in lung cancer cells; preserves ER and Golgi integrity in head and neck cancer cells; elevated in breast tumour tissues; protects from GVHD in a mouse model of leukaemia	FB1
DES	Ceramide synthesis	Induces cell cycle arrest in neuroblastoma cells	Fenretinide; ABC294640; C8-CPC
ASMase	Ceramide generation	Induces apoptosis in lymphoblasts; promotes haematogenous tumour metastasis in mouse models	Tri-cyclic anti-depressants
NSMase	Ceramide generation	Mediates cell cycle arrest in breast cancer cells; exosome release	GW4869
SPL	S1P breakdown	Induces ceramide accumulation and colon cancer cell death	THI
<i>Ceramide metabolism and pro-survival signalling</i>			
CERT	Ceramide transport from ER to Golgi	Inhibits pro-apoptotic ceramide signalling in breast cancer cells and tumours in mouse models	CHC
CERK	C1P generation	Induces breast cancer cell survival in culture and mouse models	NVP-231
GCS	GlcCer synthesis	Mediates drug resistance in patients with oral cancer and in breast cancer cells and xenografts	PPMP; PDMP
AC	Ceramide cleavage	Mediates resistance to cell death in prostate cancer cells and xenografts and elevated in tumours from patients	LCL-521
SPHK1	S1P generation	Mediates pro-survival signalling and metastasis in bladder cancer, lung cancer and melanoma cells in culture and in mouse models	PF543
SPHK2	Nuclear S1P generation	HDAC1 and HDAC2 inhibition in MCF-7 breast cancer cells; increases telomerase stability in lung cancer cells and xenografts	ABC294640

Ce tableau répertorie, en haut, les enzymes impliquées dans la synthèse du Cer, phénomène associé à la signalisation anti-tumorale et, en bas, les enzymes impliquées dans le métabolisme du Cer, phénomène associé à la signalisation pro-tumorale.

Abréviations : AC, céramidase acide; AML, leucémie aigue myéloïde; ASMase, sphingomyélinase acide; C1P, céramide-1-phosphate; C8-CPC, C8-cyclopropenylcéramide; CERK, céramide kinase; CERS, céramide synthase; CERT, protéine de transport du céramide; CHC, 3-chloro-8β-hydroxycarapin-3,8-hémiacétal; DES, dihydrocéramide désaturase; ER, réticulum endoplasmique; FB1, fumonisine B1; GVHD, maladie du greffon contre l'hôte; HDAC, histone déacétylase; NSMase, sphingomyélinase neutre; PDMP, 1-phényl-2-décanoylamino-3-morpholino-1-propanol; PPMP, 1-phényl-2-palmitoyl-3-morpholino-1-propanol; SPHK, sphingosine kinase; SPL, S1P lyase 1; SPT, sérine palmitoyltransférase; THI, tétrahydroxybutylimidazole.

2. Les effets associés au métabolisme du céramide dans le mélanome

Dans les cellules de mélanome, le métabolisme du Cer régule différentes étapes de la progression tumorale ([Carrié et al., 2020](#)) (Figure 40). Ici, nous nous focaliserons uniquement sur les effets associés à la ACDase, la GCS et les GCases.

Le Cer peut être dégradé par la ACDase, codée par le gène *ASAH1*, dont le déficit est associé à deux maladies lysosomales, la maladie de Farber et le phénotype SMA-PME. Une augmentation de l'expression de la ACDase, associée à une diminution du taux de Cer, a été montrée dans les cellules de mélanome ayant un phénotype prolifératif. Le taux abaissé de Cer serait secondaire à l'inhibition de la synthèse *de novo* mais réversé par l'utilisation d'un inhibiteur de la ACDase ([Realini et al., 2016](#)). L'inhibition génétique d'*ASAH1* (KO) dans des cellules de mélanome humain A375 se traduit par une accumulation de Cer à longue chaîne associée à un arrêt du cycle cellulaire, de la sénescence et une perte de la capacité d'auto-renouvellement ([Lai et al., 2017](#)). De plus, ces cellules normalement résistantes au traitement par doxorubicine deviennent sensibles probablement *via* l'accumulation de Cer ([Lai et al., 2021](#)). De manière intéressante, il a été décrit que la ACDase participerait au switch phénotypique des cellules de mélanome car le gène *ASAH1* serait une cible directe de MITF ([Leclerc et al., 2019](#)). Le gène *ASAH1* pourrait être aussi sous le contrôle de ERK *via* le facteur de transcription E2F1 ([Malvi et al., 2021](#)). Ainsi, l'inhibition pharmacologique de la ACDase par le Carmofur induit une augmentation de Cer qui activerait PPAR γ (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma*) et serait responsable de la diminution de la prolifération des cellules de mélanome. La croissance des cellules de mélanome humain A375 est nettement diminuée chez les souris traitées par la combinaison du carmofur et d'un BRAFi, par rapport aux souris non traitées ou traitées par monothérapie ([Malvi et al., 2021](#)).

La glycosylation du Cer en GlcCer par la GCS a été associée à l'expression de la glycoprotéine-P, une protéine transmembranaire d'efflux des drogues aboutissant à la résistance des cellules tumorales à divers traitements ([Gouazé et al., 2004](#)). De plus, le GlcCer, à la base d'autres GSL comme le ganglioside

GM3, est associé à une augmentation de la motilité des cellules cancéreuses. Ainsi, l'inhibition de la GCS a permis de réduire la croissance tumorale dans des modèles cellulaire et murin de mélanome ([Deng et al., 2002](#); [Weiss et al., 2003](#)).

Des travaux portant sur la GCase2 ont montré que son expression est diminuée dans les cellules de mélanome par rapport aux mélanocytes et qu'une augmentation de son expression est associée à de l'apoptose et à une inhibition de la croissance cellulaire *in vitro* et *in vivo*, secondaire à une augmentation de Cer ([Sorli et al., 2013](#)). A l'inverse, l'inhibition de l'expression et de l'activité de la GCase (lysosomale) est associée à une augmentation de la survie cellulaire en condition de privation de sérum ([Astudillo et al., 2016](#)).

De plus, un exome de patients porteurs de mélanome a permis de mettre en évidence 3 mutations à l'état hétérozygote dans le gène *GBA* : p.N409S, p.E365K et p.T408M (données personnelles, Prof N. Soufir, Inserm U976,). L'impact de ces mutations sur le développement et la progression des mélanomes n'est actuellement pas connu. Dans la maladie de Gaucher, la mutation p.N409S est la mutation la plus fréquente ([Taddei et al., 2009](#)) : elle représente 70% dans la population juive ashkénaze et 30% dans la population générale. Cette mutation n'affecte pas le site catalytique de l'enzyme mais est responsable d'un défaut de repliement de la protéine entraînant sa dégradation prématurée par le protéasome ([Ron and Horowitz, 2005](#)). Quant aux mutants p.E365K et p.T408M, leur pathogénicité reste très controversée ; ils sont considérés par certains auteurs comme des polymorphismes. Toutefois, quand le mutant p.E365K est retrouvé sur le même allèle qu'un autre variant pathogénique comme N409S, il n'est plus neutre et augmente la sévérité de la maladie de Gaucher ([Cullen et al., 2011](#); [Duran et al., 2013](#)). Une étude prédictive de la pathogénicité de quelques mutations de *GBA* montre qu'il existe une forte probabilité pour le mutant p.N409S et une probabilité intermédiaire pour les mutants p.T408M et p.E365K d'être pathogènes ([Barkhuizen et al., 2016](#)).

Conclusion générale et objectifs de thèse

Cette revue bibliographique de la GCase met en évidence le rôle de cette enzyme lysosomale dans plusieurs processus pathologiques comme la maladie de Gaucher, la maladie de Parkinson et le cancer. Dans le mélanome, le rôle de la GCase demeure très mal connu, il pourrait être dépendant de ses effets sur les concentrations de Cer, du GlcCer et/ou de la GlcSph.

Cette partie expérimentale s'articulera autour de deux hypothèses :

- Dans une première partie, après avoir analysé la croissance tumorale de mélanome dans des modèles murins Gaucher, nous étudierons les effets de l'inhibition de la GCase sur les caractéristiques tumorales des cellules de mélanome. Pour cela, l'inhibition de la GCase se fera par ARN interférence et par inhibition pharmacologique. Nous évaluerons également les effets du traitement par la GlcSph sur les propriétés tumorales des cellules de mélanome.
- Enfin, dans une seconde partie, nous examinerons le rôle de la GCase et de la GlcSph sur l'expression de l'alpha-synucléine.

Matériel et méthodes (1ère partie)

A. Lignées cellulaires

Les cellules de mélanome murin B16F10 (issues de souris C57BL/6) proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection). Les lignées de mélanome humain A375 et les cellules de mélanome murin B16F10 ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Life Technologies) à 4,5 g/L de glucose enrichi avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté et contenant le mélange pénicilline/streptomycine. Les cellules de mélanome primaire humain WM35 ont été cultivées dans un milieu contenant 80% de milieu filtré MCDB (Sigma-Aldrich), complété avec du bicarbonate de sodium (17,86 mM) dont le pH a été ajusté à 7,4 et 20% de milieu Leibovitz L15 (Gibco, Thermo Fischer Scientific) supplémenté avec du calcium (1,68 mM), de l'insuline humaine (5µg/mL Sigma-Aldrich) et 2% de SVF. Toutes les cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂ et ont été passées par traitement à la trypsine, lorsque la confluence était atteinte.

B. Transfection des shARN

La lignée A375 a été transfectée de façon stable par des shARN dirigés contre *GBA* humain, clonés dans le plasmide pLKO-1 permettant une sélection stable à l'aide de la puromycine. Les cellules A375 ont été transfectées en présence de Lipofectamine 2000 (1 mg/ml, Invitrogen®, référence : 11668-019) avec le plasmide pLKO-1 (4µg), contenant un shARN dirigé contre *GBA* humain (Mission shNRA NM-000157/TRCN0000029298, Sigma-Aldrich®). A 48h, de la puromycine (1µg/ml, Invivogen) a été ajoutée. Trois transfectants stables différents, nommés shCtrl, sh1 et sh2, ont été isolés par dilution limite. Ces cellules ont déjà été utilisées pour des travaux précédents ([Astudillo et al., 2016](#)).

C. 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 ([Xu et al., 2003](#)). L'autre modèle est une souris hétérozygote composite D409V/Null (409/null) obtenue par croisement d'une souris wt/Null avec une souris D409V/D409V ([Xu et al., 2003](#)). La souris 409/409 a un fond génétique composé de 50% de C57BL/6J et 50% de 129SvEvBrd, tandis que la souris 409/null 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, les lignées de souris suivantes ont été élevées: 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 réglementation, après approbation du protocole par le comité d'éthique Midi-Pyrénées.

D. Drogues

Les produits suivants ont été utilisés : CBE, fourni par Toronto Research Chemicals, référence : C666000 ; DMSO fourni par Euromedex, référence : UD8050-05 ; éthanol (EtOH) absolu fourni par Fischer, référence : BP 2818-500; GlcSph, fourni par Merck, référence : 43659; Carmofur, fourni par Sigma, référence C1494; Dabrafénib, fourni par Selleckchem, référence : S2807.

E. Analyse de la croissance tumorale

Après culture, des cellules B16F10 (3×10^5) ont été récoltées, mises en suspension dans du tampon phosphate salin (PBS) puis injectées par voie sous-cutanée (ou par voie intra-dermique dans certains

cas) dans le flanc 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 ont été prélevés, pesés, puis immédiatement congelés et conservés à -80°C.

F. Activité enzymatique de la glucosylcéramidase

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 dans 500µL de Triton X-100 (0,2%), puis soniqués (sonicateur à mèche) pendant 20 secondes, à 4°C. Après dosage du contenu en protéines par la méthode de Bradford ([Bradford, 1976](#)), 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 acétate, 1M, pH 4 est mélangé avec du taurocholate de sodium (Sigma, T4009) 20 mM, pH 5,5, repris dans du Triton X100. Le substrat est ajouté au lysat dilué dans du tampon citrate-phosphate, 1M, pH 4, 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 fluorescence a été mesurée ($\lambda_{exc} = 358 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 448 \text{ nm}$) et le signal de fluorescence enregistré a été comparé à celui émis par une gamme de concentrations de 4-méthylumbelliférone. L'activité spécifique de la GCase a été exprimée en nmol/h.mg de protéines.

G. Western Blot

Les culots cellulaires ont été resuspendus dans un tampon de lyse (Cell signaling, référence #9803) contenant des antiprotéases (Sigma, référence : 11873580001), puis soniqués et centrifugés à 4°C pendant 10 min à 14000g. La concentration en protéines a été déterminée selon la méthode de Bradford ([Bradford, 1976](#)). Les extraits protéiques (40µg) ont été ensuite soumis à la séparation électrophorétique dans un gel dénaturant de polyacrylamide/pré-coulé Biorad. Après transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose, la membrane a été saturée pendant 1h avec une

solution tampon Tris (TBS, *Tris-buffered saline*) contenant 0,1% de Tween-20 (TBST) et 5% de lait écrémé. La GCCase a été détectée par un anticorps monoclonal de souris anti-GCase humaine (Abcam), dilué au 1/1000 dans du TBST 5% d'albumine bovine (BSA), incubé toute la nuit à 4°C. Un anticorps de lapin anti- β -actine (clone 13ES, Cell signaling, référence #4970) a été utilisé pour un contrôle de charge. La révélation a été réalisée après incubation avec un anticorps secondaire de souris ou de lapin couplé à la peroxydase, dilué au 1/5000 et addition de son substrat chimiluminescent (ECL, Pierce®). La révélation des gels a été réalisée grâce à l'imageur Chemidoc (Biorad ®) et l'analyse des membranes avec le logiciel ImageLab, Biorad.

H. Analyse des sphingolipides

Les SL des prélèvements de foie et de rate ont été analysés par la plateforme de lipidomique MetaToul (Inserm U1048, Toulouse). Les lipides ont été extraits selon la méthode de Bligh et Dyer ([Bligh and Dyer, 1959](#)) et analysés par méthode LC-MS.

Des culots cellulaires ont été préparés à partir de cellules A375ensemencées en flasques de 75 cm² (T75) qui ont été traitées ou non (véhicule) avec de la GlcSph à 2,5 et à 5 μ M pendant 24h ou avec du CBE à 30 μ M pendant 48h. Des culots ont également été réalisés à partir de T75 de A375 shCtrl, sh1 et sh2. Les culots cellulaires ont ensuite été analysés au laboratoire de Biochimie Métabolique des Hospices Civils de Lyon, grâce à la collaboration des Drs Magali Pettazzoni et David Cheillan. Pour l'analyse des lysosphingolipides (comprenant lysohexosylcéramides, lyso-Gb3, lysoSM et lysoSM509) et des bases sphingoïdes (So, Sa, et S1P), l'extraction a été réalisée d'après la méthode décrite par ([Boutin et al., 2012](#)) puis adaptée selon Pettazzoni et al. ([Pettazzoni et al., 2017](#)). A noter que la technique de séparation utilisée ne permet pas de distinguer les 2 épimères GlcSph et galactosylsphingosine (GalSph). Toutefois, par souci de simplification, nous présenterons les concentrations cellulaires de monohexosylsphingosine évaluées par spectrométrie de masse sous le nom de GlcSph. Les extraits ont ensuite été analysés par une méthode LC-MS/MS. Pour l'analyse des SL (comprenant hexosylcéramide, sm, Cer et ganglioside), une extraction selon la méthode de Kirklund

a été réalisée comme précédemment décrite ([Le Barz et al., 2021](#)). Les extraits ont été analysés par méthode MS/MS (API 4500 QTRAP MS/MS; Sciex Applied Biosystems).

I. Etude de la prolifération cellulaire

La prolifération a été évaluée à l'aide de l'Incucyte (Essen BioScience, Ann Arbor, MI, USA) qui est un système de visualisation et d'analyse en temps réel de la croissance cellulaire. Les images ont été prises à intervalles réguliers que l'on prédéfinit, à l'objectif 10x. Ce système permet de mesurer la confluence des cellulesensemencées. La croissance cellulaire a été calculée en rapportant la confluence à chaque temps à la confluence au moment du traitement puis a été ensuite rapportée à la condition contrôle c'est-à-dire traitée par le véhicule seul (éthanol ou DMSO) ou transfectée avec le shCtrl.

Dans une plaque 96 puits, les cellules A375 ont été traitées 24h après l'ensemencement (10 000 cellules par puits dans 200µl de milieu) avec le traitement à tester et avec le véhicule correspondant. Chaque étude de prolifération a été réalisée en réplicat technique et en triplicats biologiques.

J. Etude de la 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®). Ce test repose sur la capacité des mitochondries fonctionnelles des cellules vivantes à réduire le MTT en cristaux de formazan bleus.

Dans une plaque 96 puits, les cellules A375 ont été traitées 24h après l'ensemencement (10 000 cellules par puits dans 200µl de milieu) avec le traitement à tester et avec le véhicule correspondant. A la fin de la période de traitement définie, le MTT (0,5 mg/ml) a été ajouté pendant 3h à 37°C. Après le retrait du milieu, l'ajout de 200µl de DMSO permet de dissoudre les cristaux et l'intensité de la coloration a été mesurée par spectrophotométrie à 560 nm. Une dilution dans le DMSO est réalisée si l'intensité est supérieure à 1. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de viabilité par rapport aux cellules recevant le véhicule.

K. Etude de la mort cellulaire

La mort cellulaire a été évaluée par un double marquage annexine-V/7-AAD (kit Tonbo, référence : 35-6410). L'annexine V est une protéine qui possède une forte affinité pour les phosphatidylsérines (physiologiquement localisées dans le feuillet interne de la membrane plasmique), et couplée à un fluorophore comme le FITC, elle permet donc de détecter les cellules en phase d'apoptose précoce par cytométrie en flux. L'annexine V ne peut pas se lier aux cellules viables, celles-ci n'exposant pas de phosphatidylsérines à leur surface. Le 7-AAD se lie de manière réversible à l'ADN des cellules perméabilisées. Ce double marquage permet de distinguer 4 populations : les cellules vivantes, 7-AAD/annexine V double négatives; les cellules en apoptose précoce, 7-AAD négatives et annexine V positives; les cellules en nécrose, 7-AAD positives et annexine V négatives, et les cellules mortes, doubles positives.

Dans des flasques T25, les cellules A375 ont été traitées 24h après l'ensemencement (2 millions de cellules par flasque dans 5 ml de milieu) avec la GlcSph à 1, 2,5 et 5 μ M ou son véhicule (éthanol, EtOH). A 12h et à 24h, les cellules ont été marquées selon le protocole du kit et aussitôt analysées au cytomètre de flux (MACSQuant VYB). Pour l'acquisition, l'établissement des seuils a été réalisé grâce à des cellules non marquées et des cellules marquées. Après exclusion des doublets, 20 000 événements ont été acquis pour chaque condition et analysés secondairement sur le logiciel FlowJo®. Les résultats ont été rapportés aux cellules recevant le véhicule.

L. Etude du cycle cellulaire

La distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été évaluée par le marquage à l'iodure de propidium (IP) (MERCK®, référence : P4170) qui se lie de façon réversible à l'ADN des cellules.

Dans des flasques T25, les cellules A375 ont été traitées 24h après l'ensemencement (2 million de cellules par flasque dans 5 ml de milieu) avec la GlcSph à 1, 2.5 et 5 μ M ou son véhicule (EtOH). A 24h,

48h et à 72h, le milieu ainsi que les cellules trypsinisées sont récupérés afin de préparer un culot sec. Après fixation dans l'EtOH 70% froid pendant 30mn à -20°C puis traitement par la RNase A (10µg/ml) (MERCK®, référence : R4642-10mg), les cellules ont été marquées à l'IP (50µg/ml) puis analysées au cytomètre de flux (MACSQuant VYB). Après exclusion des doublets, 20 000 événements ont été acquis pour chaque condition et analysés secondairement sur le logiciel FlowJo®. Des cellules, traitées par la blebbistatine 10µM (MERCK®, référence : B0560-1MG), un inhibiteur de myosine, ont permis d'avoir un profil type de cellules multinucléées. Les résultats ont été rapportés aux cellules recevant le véhicule.

M. Immunofluorescence

Les cellules A375 ont étéensemencées (30 000 cellules par puits) dans une lame à 8 puits (Lab-Tek, Nunc, Thermofisher). Après 24h, les cellules ont été traitées avec de la GlcSph à 5µM pendant 48h. Puis les cellules ont été fixées dans du paraformaldehyde (4%) pendant 10 minutes. Après lavages au PBS, les cellules ont été incubées dans du PBS contenant 5% de BSA et 0.1% de saponine (Sigma-Aldrich) pendant 20 minutes puis avec de la phalloïdine, qui se fixe à l'actine, conjuguée à l'Alexa Fluor 488 (A12379, Life Technologies) pendant 1 h à température ambiante et dans l'obscurité. Les cellules ont été ensuite lavées puis leur noyau a été marqué avec le DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) pendant 15 minutes. Enfin le montage de la lame a été fait à l'aide du vectashield. L'acquisition des images a été réalisée au microscope confocal LSM 780 (Zeiss).

N. Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été analysées par GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., California, US). La significativité des différences entre les moyennes a été évaluée par différents tests statistiques comme indiqué dans la légende des figures. Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

Résultats expérimentaux (1^{ère} partie)

I. Résultats antérieurs : Etude *in vivo*

A. La croissance du mélanome est exacerbée dans les modèles murins Gaucher $Gba1^{D409V/null}$ et $Gba1^{D409V/D409V}$.

Afin de tester le rôle de l'inhibition de la GCCase dans la progression tumorale, des cellules de mélanome murin B16F10 ont été injectées en sous-cutané à des souris qui constituent un modèle reconnu de maladie de Gaucher de type 1 : il s'agit des modèles hétérozygotes composites $D409V/null$ et homozygotes $D409V/D409V$ déjà décrits ([Xu et al., 2003](#)).

L'analyse du volume (Figure 43A) et du poids tumoral (Figure 43B) montre que la croissance tumorale est plus importante chez les souris $Gba1^{D409V/null}$ par rapport aux souris sauvages. La mesure de l'activité de la GCCase réalisée sur le foie et la rate de ces animaux objective une diminution nettement significative comparée aux souris sauvages (Figure 43C et D). La mesure du poids de la rate ne montre aucune différence entre les souris, indiquant l'absence de splénomégalie à cet âge (Figure 43B). Ainsi, le déficit en GCCase favoriserait la croissance des cellules de mélanome.

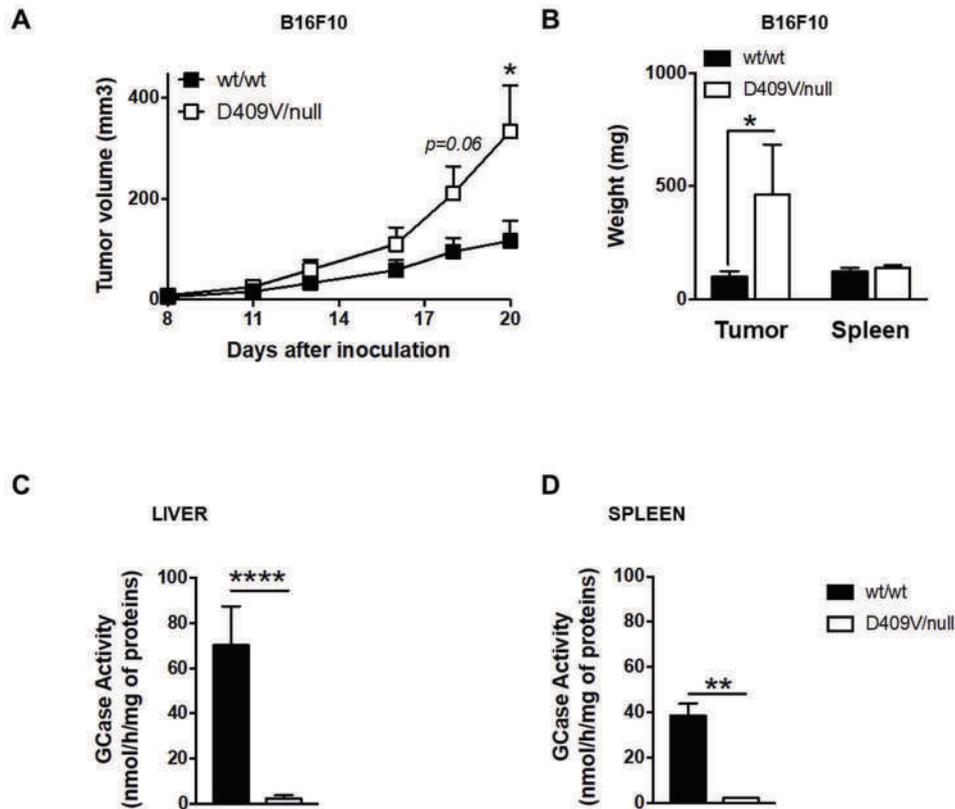


Figure 43. Croissance tumorale du mélanome chez des souris $Gba1^{D409V/null}$.

A. 3×10^5 cellules de mélanome murin B16F10 ont été injectées en sous-cutané à des souris $Gba1^{D409V/null}$ (D409V/null) et à des souris sauvages (wt/wt) ayant le même fond génétique (19-22 semaines de vie). Le volume tumoral a été mesuré tous les 3 jours. **B.** Le poids des tumeurs et des rates a été mesuré 25 jours après l'inoculation tumorale. Les données sont exprimées sous la forme de la moyenne \pm SEM d'au moins 2 expériences ($n=7$ à 21 souris). **C, D.** L'activité de la GCase a été mesurée dans le foie (**C**) et dans la rate (**D**) qui ont été prélevés dans les souris D409V/null et wt/wt. Expériences réalisées en double sur les échantillons de 3 à 6 souris (18-22 semaines de vie). Les comparaisons ont été faites en utilisant le test de Mann-Whitney. Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$.

Les cellules B16F10 ont aussi été injectées en sous-cutané dans un autre modèle murin Gaucher homozygote D409V (409/409) et dans des souris hétérozygotes pour la mutation D409V (409/wt) de fond génétique double. L'analyse du volume (Figure 44A) et du poids tumoral (Figure 44B) montre que la croissance tumorale est plus importante chez les souris homozygotes 409/409 par rapport aux souris hétérozygotes 409/wt. Comme dans le précédent modèle, la mesure du poids de la rate ne montre aucune différence entre les souris (Figure 44B). La mesure de l'activité de la GCase réalisée sur le foie et la rate de ces animaux retrouve une diminution nettement significative comparée aux souris hétérozygotes 409/wt (Figure 44C et D).

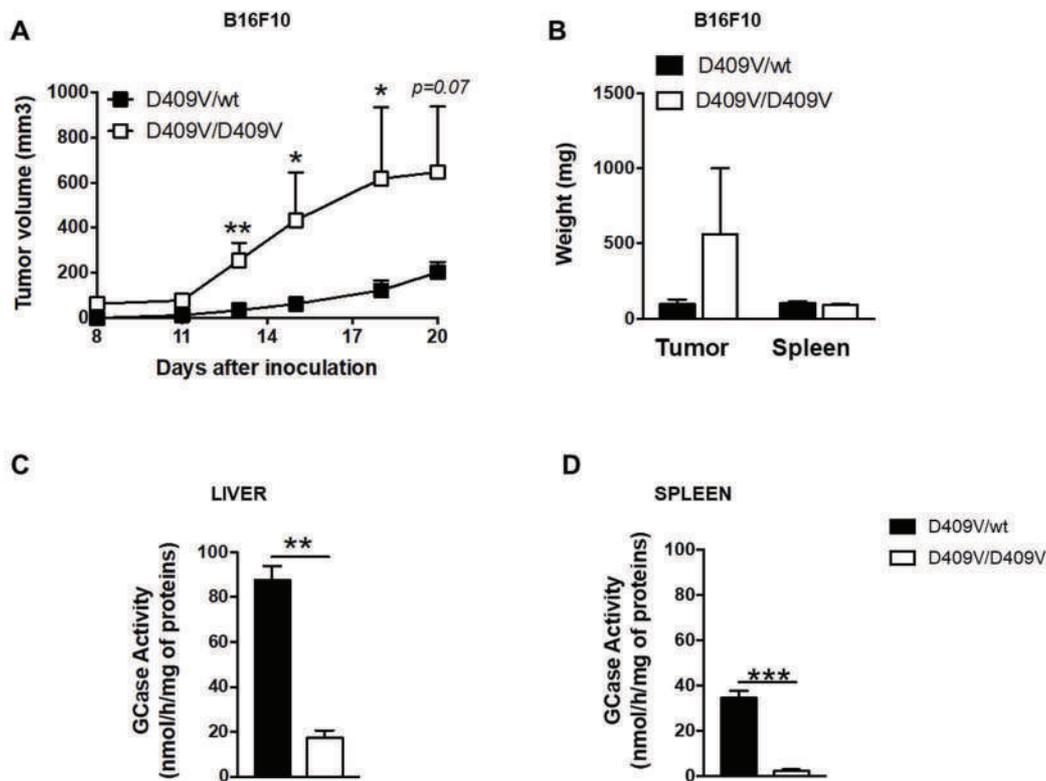


Figure 44. Croissance tumorale des mélanomes chez les souris $Gba1^{D409V/D409V}$ et $Gba1^{D409V/wt}$.

(A) 3×10^5 cellules de mélanome murin B16F10 ont été injectées en sous-cutané à des souris $Gba1^{D409V/D409V}$ (D409V/D409V) et à des souris hétérozygotes (D409V/wt) ayant le même fond génétique (19-22 semaines de vie). Le volume tumoral a été mesuré tous les 3 jours. (B) Le poids des tumeurs et des rates a été mesuré 20 jours après l'inoculation tumorale. Les données sont exprimées sous la forme de la moyenne \pm SEM d'au moins 2 expériences (n=7 à 21 souris). (C, D) L'activité de la GCase a été mesurée dans le foie (C) et dans la rate (D) qui ont été prélevés dans les souris D409V/D409V et D409V/wt. Expériences réalisées en double sur les échantillons de 3 à 6 souris (18-22 semaines de vie). Les comparaisons ont été faites en utilisant le test de Mann-Whitney. Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.0001$.

Afin d'évaluer l'impact du déficit enzymatique en GCase sur le métabolisme du Cer dans les organes, une analyse des SLs a été réalisée sur les foies et les rates. Les résultats montrent une augmentation significative des concentrations du GlcCer et de la GlcSph dans le foie (Figure 45A) et la rate (Figure 45B) des souris homozygotes (D409V/D409V) par rapport aux souris hétérozygotes (D409V/wt). Aucune différence significative dans les concentrations de la SM, du Cer, du lactosylcéramide (LacCer), du GM3 et du dihydrocéramide (DHCer) n'a été observée.

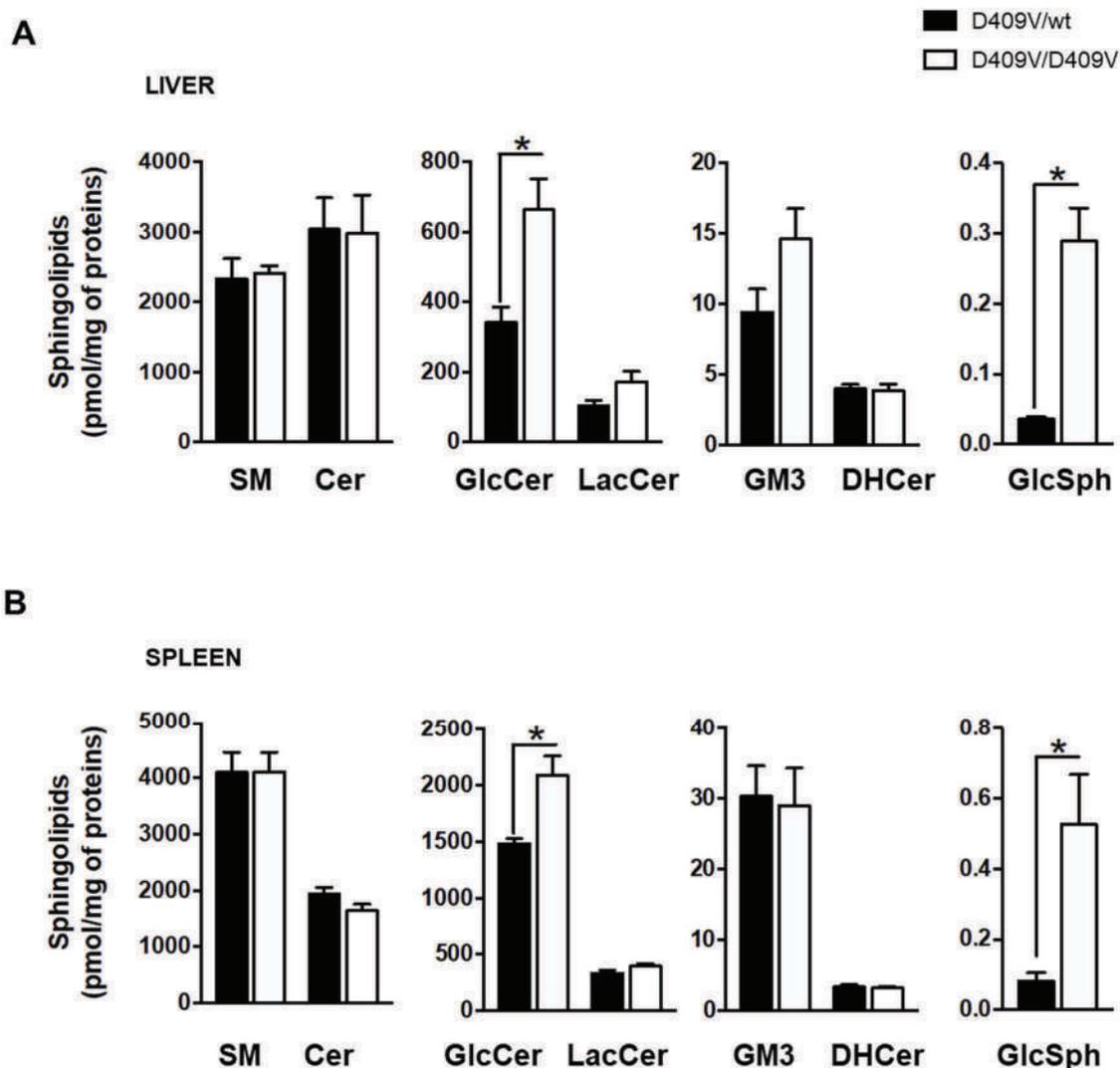


Figure 45. Analyse sphingolipidomique du foie et de la rate chez les souris $Gba1^{D409V/D409V}$ et $Gba1^{D409V/wt}$.

Analyse sphingolipidomique par spectrométrie de masse des foies (A) et des rates (B) des souris $Gba1$ homozygotes ($D409V/D409V$) et des souris hétérozygotes ($D409V/wt$) ayant le même fond génétique (18-21 semaines de vie). Expériences réalisées en double sur des échantillons prélevés à J20 de 3 à 6 souris (18-22 semaines de vie). Les comparaisons ont été faites en utilisant le test de Mann-Whitney. Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives : *, $p < 0.05$. SM, sphingomyéline ; Cer, céramide ; LacCer, lactosylcéramide ; DHCer, dihydrocéramide.

L'ensemble de ces résultats montre une croissance tumorale favorisée dans les souris Gaucher comparée aux souris contrôles suggérant un rôle de la GCase dans la progression tumorale. De plus, ces modèles présentent une augmentation des taux de GlcCer et GlcSph dans la rate et le foie, pouvant suggérer un rôle de ces lipides dans la progression tumorale.

II. Résultats de thèse : Etude *in vitro*

A. Expression et activité de la glucosylcéramidase dans le mélanome

Peu de données existent dans la littérature quant à l'expression de la GCCase dans les pathologies malignes et dans le mélanome cutané en particulier ([Astudillo et al., 2016](#)). Une analyse bioinformatique des transcrits de *GBA* à partir de 2 cohortes (Kunz ([Kunz et al., 2018](#)) et TCGA ([Cancer Genome Atlas Network, 2015](#))) a révélé une expression accrue dans les mélanomes par rapport aux naevi ainsi qu'une augmentation des transcrits dans les tumeurs métastatiques par rapport aux tumeurs primaires (Figure 46A-B). Pour vérifier ces données, nous avons mesuré l'activité enzymatique de la GCCase dans les différentes lignées de mélanome humain disponibles au laboratoire. Nos résultats montrent une forte diminution de l'activité GCCase dans les cellules tumorales par rapport à l'activité mesurée dans des mélanocytes. La diminution est plus marquée et significative dans les lignées métastatiques (Figure 46C). Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que l'activité catalytique de la GCCase diminue avec la progression tumorale et que cette diminution ne serait pas secondaire à une diminution de la transcription de *GBA* mais à une modification post-transcriptionnelle.

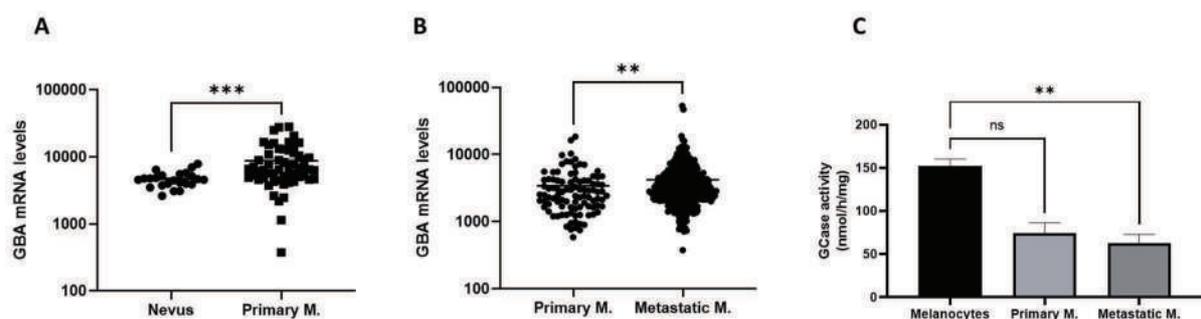


Figure 46. Expression et activité de la GCCase en fonction du stade du mélanome humain.

A et B. Expression des transcrits de *GBA* dans des naevi et des mélanomes. **A.** Données issues de la cohorte Kunz (d'après la base de données Oncogene (2018)) comprenant 23 naevi et 57 mélanomes primaires humains (Primary M.). **B.** Données issues de la cohorte TCGA comprenant 97 mélanomes primaires (Primary M.) et 361 mélanomes métastatiques (Metastatic M.). Les différences statistiques ont été déterminées en utilisant le test de Mann-Whitney. **C.** Activité de la GCCase, déterminée avec un substrat fluorogénique, dans des lysats de mélanocytes primaires humains et de lignées de mélanome humain non métastatiques (n=3) et métastatiques (n=11). L'activité enzymatique est exprimée en nmol/h.mg de protéines (moyenne +/- SEM de 1 à 6 expériences indépendantes). Les comparaisons

ont été faites en utilisant le test de Kruskal-Wallis. Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives : **, $p < 0.01$, ***, $p < 0,001$. ns, non significatif.

B. Génération de modèles cellulaires d'inhibition génétique et pharmacologique de la glucosylcéramidase

Afin d'étudier les effets du déficit de la GCCase dans le mélanome, nous avons généré des cellules de mélanome métastatique A375 dans lesquelles l'expression et/ou l'activité de la GCCase ont été très fortement abaissées :

1- des cellules dans lesquelles des shARN dirigés contre *GBA* ont été introduits ([Astudillo et al., 2016](#)). La figure 47 montre que dans les cellules A375 sh1 et sh2 l'expression protéique (Figure 47A) et l'activité de la GCCase (Figure 47B) sont fortement diminuées, comparées à celles des A375 parentales ou A375 shCtrl. Cependant, aucune augmentation significative des taux de GlcSph et de GlcCer n'est retrouvée dans les cellules transfectées avec le sh1 et le sh2 par rapport aux cellules contrôles ou non transfectées. De façon surprenante, les cellules transfectées avec le shCtrl présentent un taux de GlcSph significativement plus élevé que les cellules non transfectées (Figure 47C).

2- des cellules traitées par le CBE, un inhibiteur pharmacologique irréversible de la GCCase. Le traitement des cellules A375 avec 30 μ M de CBE pendant 48h réduit très fortement et de manière significative l'activité de la GCCase (Figure 47D) et augmente significativement le taux cellulaire de GlcSph (Figure 47E). Le taux de GlcCer, quant à lui, reste inchangé (Figure 47E).

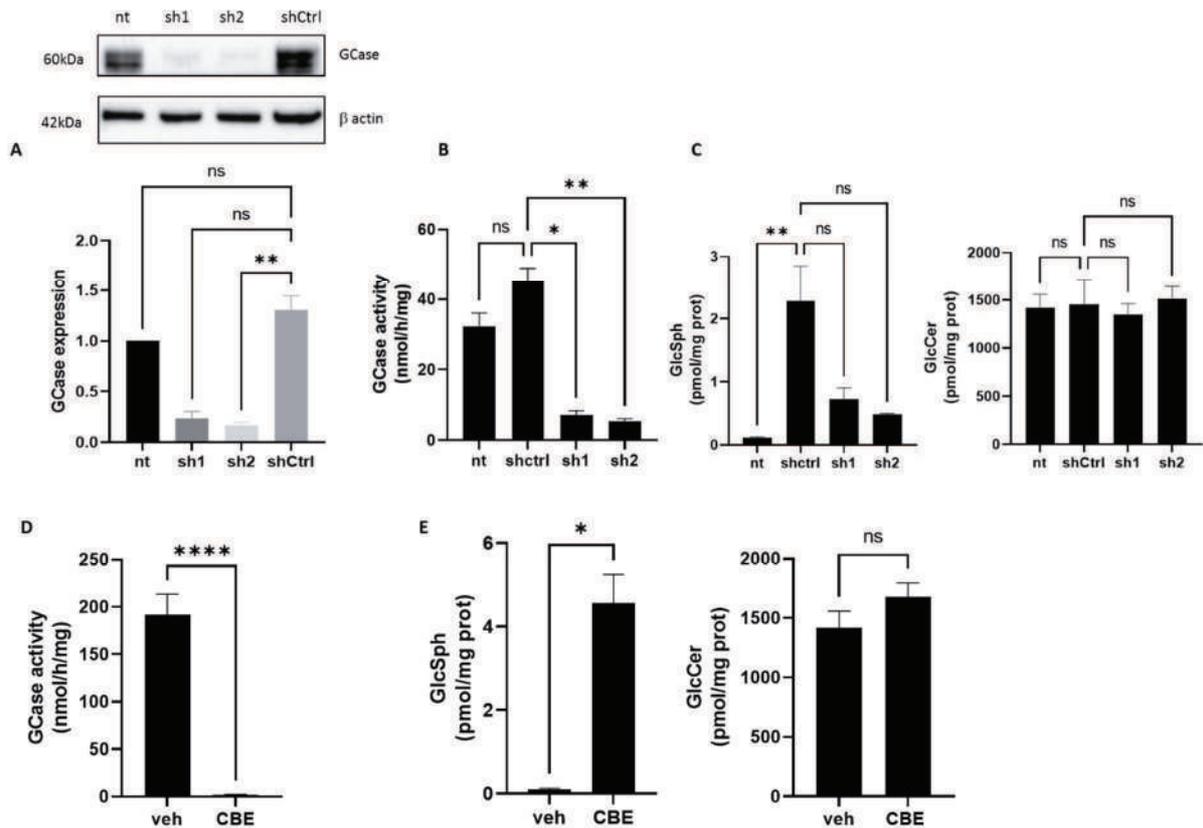


Figure 47. Génération de modèles cellulaires de mélanome humain dans lesquels la GCase a été inhibée.

A-C: les cellules A375 ont été transfectées ou non avec différents shARN dirigés contre *GCase*. Trois lots de cellules ont été sélectionnés après culture en présence de puromycine : shCtrl, sh1 et sh2. **A.** L'expression de la GCase a été évaluée par Western Blot et la quantification a été rapportée aux cellules shCtrl. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. **B.** L'activité enzymatique de la GCase a été testée avec un substrat fluorogénique, et les valeurs obtenues ont été rapportée aux cellules shCtrl. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 3-5 expériences indépendantes. **C.** Concentrations de la GlcSph et du GlcCer évaluée par spectrométrie de masse, et rapportée aux cellules shCtrl. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. **D-E.** Les cellules A375 ont été traitées 48h avec du CBE à 30 μ M ou le DMSO (veh). **D.** L'activité enzymatique de la GCase a été testée avec un substrat fluorogénique, et les valeurs obtenues ont été rapportée aux cellules traitées par le véhicule. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 8 expériences indépendantes. **E.** Concentrations de la GlcSph et du GlcCer évaluée par spectrométrie de masse, et rapportée aux cellules traitées par le véhicule. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. Les comparaisons des données ont été faites en utilisant les tests de Kruskal-Wallis pour A-C et de Mann-Whitney pour D-E. Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives : *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ****, $p < 0.0001$. ns, non significatif.

C. L'inhibition de la glucosylcéramidase ne modifie pas la prolifération *in vitro* des cellules de mélanome

Pour évaluer le rôle de la GCCase dans la prolifération des modèles cellulaires de mélanome précédemment décrits, une analyse de la croissance cellulaire a été réalisée à l'aide de l'Incucyte, un automate possédant un système de visualisation et d'analyse en temps réel de la croissance cellulaire *in vitro*. Les résultats montrent que la prolifération des cellules A375 traitées au CBE est la même que celle de cellules non traitées (Figure 48A et B). De la même manière, la prolifération des cellules de mélanome dans lesquelles la GCCase a été inhibée par une approche génétique est identique à celle des cellules parentales ou shCtrl (Figure 48C et D). Ainsi, l'inhibition de la GCCase ne modifie pas la prolifération *in vitro* des cellules de mélanome A375.

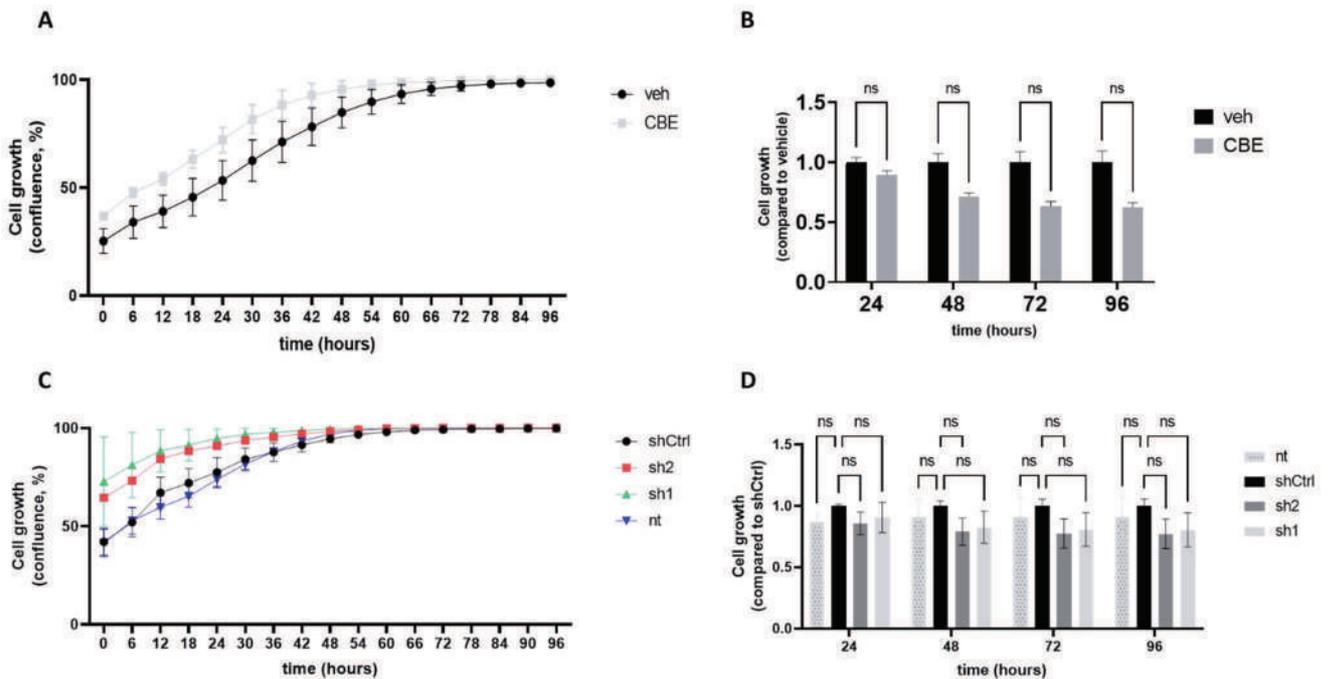


Figure 48. Effet de l'inhibition de la GCCase sur la prolifération des cellules de mélanome humain A375.

A et B. Cellules traitées au CBE 30 μ M ou avec du DMSO (veh). **C et D.** Cellules non-transfectées (nt) et transfectées avec le shCtrl, le sh1 et le sh2. La croissance cellulaire a été évaluée par la mesure de la confluence par l'automate Incucyte. **A et C.** Représentation de la croissance cellulaire d'une seule culture réalisée en duplicat. **B-D.** La confluence a été mesurée toutes les 24h pendant 96h. Les valeurs obtenues pour les cellules traitées au CBE et celles exprimant un sh dirigé contre *GBA* ont été respectivement rapportées à celles des cellules traitées par le DMSO ou exprimant le shCtrl. Les

résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes. Les comparaisons ont été examinées en utilisant le test two-way Anova avec correction Geisser-Greenhouse. ns, non significatif.

D. La glucosylsphingosine diminue la croissance des cellules de mélanome *in vitro*

Nous avons observé que l'inhibition génétique ou pharmacologique de la GCCase n'a pas d'effet sur la croissance cellulaire *in vitro*. Ceci pourrait être lié à une faible accumulation de GlcSph (Figure 47C et E). Afin d'étudier les effets dépendants de la GlcSph, des cellules A375 ont été traitées par des concentrations croissantes de GlcSph (1, 2,5 et 5 μ M). La croissance de ces cellules a été évaluée par la mesure de la confluence pendant 72h (Incucyte). Une diminution significative a été observée dans les 24 premières heures pour les cellules traitées par rapport aux cellules non traitées (véhicule). Cette diminution est dose-dépendante et transitoire puisque les courbes de croissance rejoignent celle des cellules traitées avec le véhicule (Figure 49A et B). Les mêmes résultats ont été obtenus dans les cellules WM35, une lignée de mélanome primaire mutée pour BRAF (BRAFFV600E) (Figure 49C). Ces résultats montrent une diminution de la croissance cellulaire *in vitro* induit par la GlcSph.

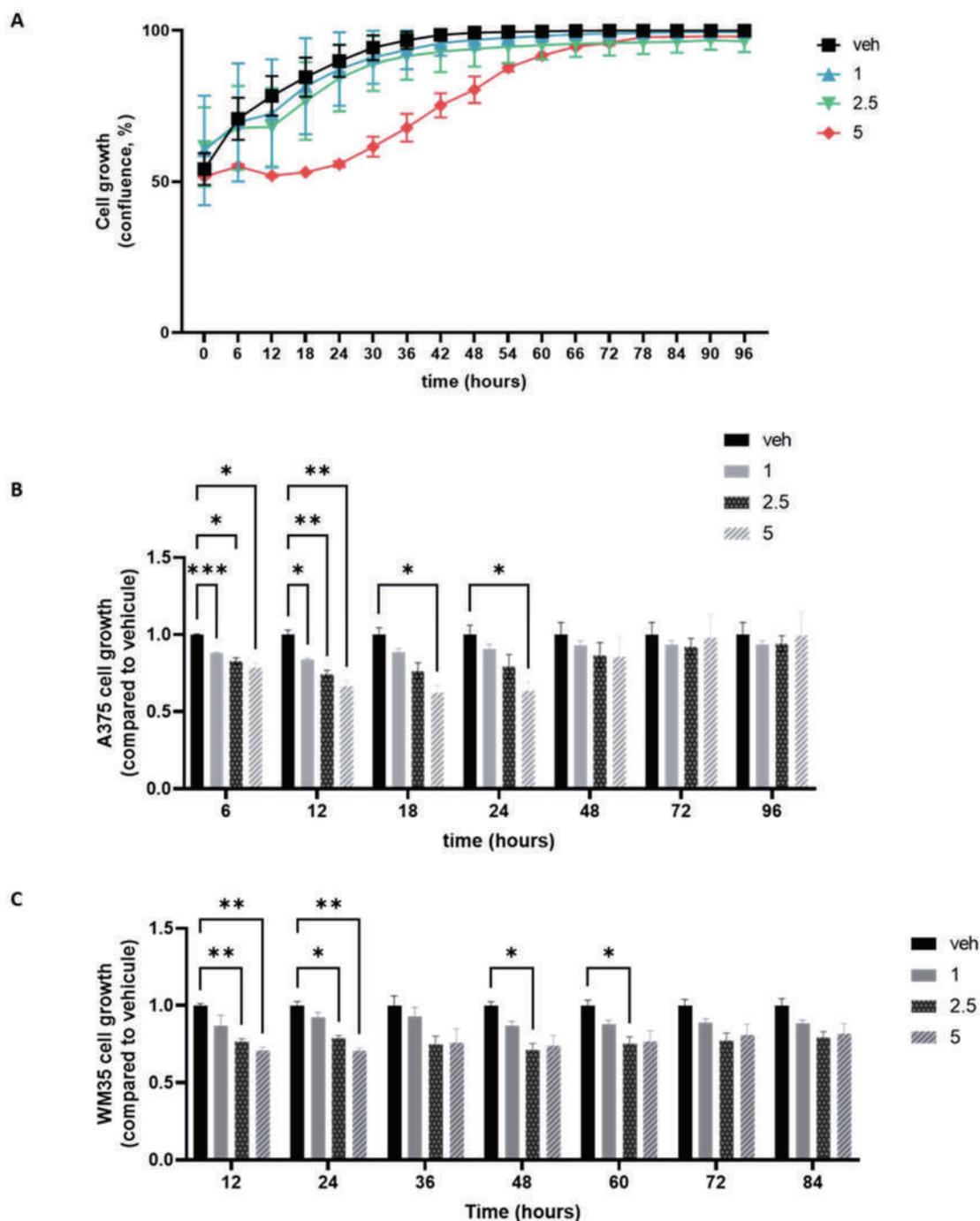


Figure 49. Effet de la GlcSph sur la croissance des cellules de mélanome A375 et WM35.

Les cellules A375 et WM35 ont été traitées avec différentes concentrations de GlcSph (1, 2,5 et 5 μ M) ou par l'EtOH (veh). Etude de la croissance des cellules évaluée par la mesure de la confluence par l'automate Incucyte. **A.** Représentation de la croissance cellulaire d'une seule culture A375 réalisée en duplicat. La confluence des cellules A375 (**B**) et WM35 (**C**) a été mesurée à différents temps pendant 96h et les valeurs obtenues pour les cellules traitées par la GlcSph ont été rapportées à celles des cellules traitées par le véhicule. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. Les comparaisons ont été effectuées en utilisant le test two-way Anova. Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives : *, $p < 0.05$, **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$.

E. La glucosylsphingosine induit la nécrose des cellules de mélanome *in vitro*

Pour évaluer un potentiel rôle toxique de la GlcSph, la viabilité des cellules A375 a été mesurée par des tests MTT. Nos résultats montrent une diminution de la viabilité des cellules traitées avec 2,5 μ M de GlcSph à 48h ainsi qu'avec 5 μ M à 24h et 48h. Après 72h de traitement, aucune différence n'est observée entre les différentes conditions. La GlcSph diminue donc la viabilité cellulaire mais cet effet semble réversible (Figure 50A).

Pour préciser les causes de la diminution de la viabilité cellulaire induite par la GlcSph, un double marquage 7-AAD et annexine V suivi d'une analyse en cytométrie de flux, permettant d'évaluer la mort cellulaire, a été réalisé. A 24h, les traitements par 2,5 et 5 μ M de GlcSph induisent une augmentation significative des cellules en nécrose (7-AAD+ et Annexine V-) par rapport aux cellules contrôles (véhicule) (Figure 50B-C). Ainsi, la diminution de croissance et viabilité cellulaires retrouvée dans les 24 premières heures après traitement par la GlcSph pourrait être secondaire à une mort nécrotique.

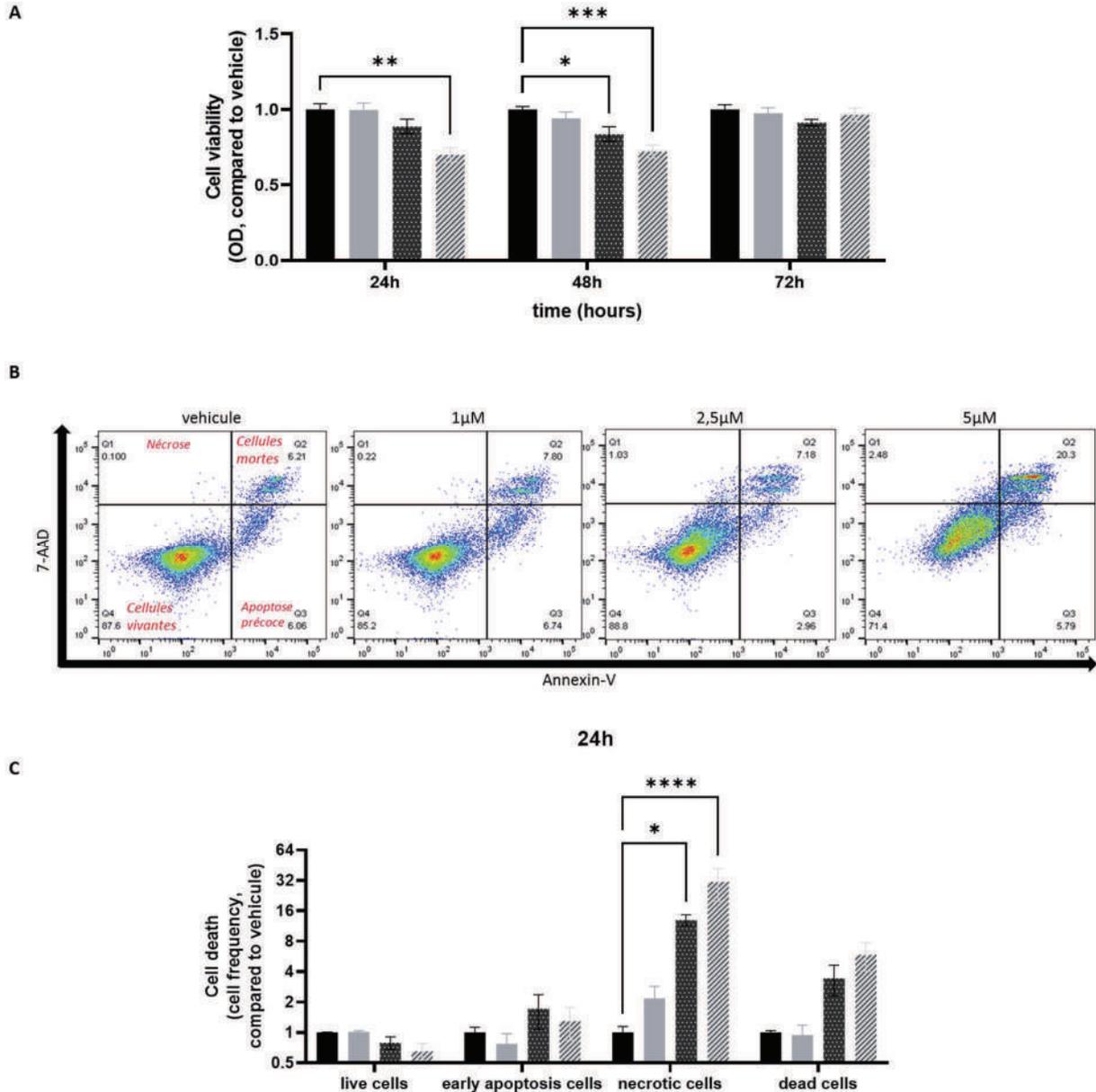


Figure 50. Effet de la GlcSph sur la viabilité et la mort cellulaire des cellules de mélanome A375.

Les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de GlcSph (1, 2,5 et 5µM) ou par l'EtOH (veh). **A. Etude de la viabilité**, évaluée par le test MTT. La densité optique a été mesurée à 24h, 48h et 72h et les valeurs obtenues pour les cellules traitées par la GlcSph ont été rapportées à celles des cellules traitées par le véhicule. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM de 4 expériences indépendantes. **B-C. Etude de la mortalité cellulaire**, évaluée par le double marquage 7-AAD/annexine V, des cellules traitées par la GlcSph ou par le véhicule. **B.** Représentation en dot plots de la mortalité cellulaire d'un lot cellulaire traité avec les différentes concentrations de GlcSph ou avec le véhicule **C.** La proportion cellulaire des différents groupes (cellules vivantes, cellules en apoptose précoce, cellules en nécrose et cellules mortes par nécrose ou apoptose) (cf. méthodes) a été mesurée à 24h et les valeurs obtenues pour les cellules traitées par la GlcSph ont été rapportées à celles des cellules traitées par le véhicule. Les résultats obtenus sont exprimés en moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes (plus de 20 000 événements ont été acquis et analysés). Les comparaisons ont été effectuées en utilisant le test two-way Anova. Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives : *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, ****, $p < 0.0001$.

F. La glucosylsphingosine génère des cellules de mélanome multinucléées

Pour explorer le mécanisme qui entraîne la diminution de la croissance, le cycle cellulaire des cellules traitées par GlcSph a été étudié à 24h, 48h et 72h, par un marquage à l'iodure de propidium (IP). Les résultats montrent que la GlcSph à 5 μ M induit une diminution des cellules en phase G1, qui représentent des cellules diploïdes (2N), à 24h, 48h et 72h (Figure 51A-C). Cet effet est aussi visible à 48h avec des concentrations plus faibles de GlcSph en comparaison aux cellules traitées avec le véhicule. De plus, une diminution des cellules en phase S est observée à 24h dans les cellules sous 5 μ M de GlcSph, indiquant un ralentissement de la prolifération cellulaire (Figure 51A), ce qui corrobore la diminution de la croissance cellulaire observée à l'Incucyte dans les mêmes conditions (Figure 51A et B). Cette diminution est suivie d'une augmentation des cellules en phase S et G2M à 48h et 72h de traitement (Figure 51B et C). Ces résultats sont en accord avec les données obtenues à l'Incucyte (Figure 51A et B). L'ensemble de ces données montrent que la GlcSph peut induire une diminution de la prolifération (sans blocage du cycle) associée à de la mort cellulaire par nécrose dans les 24 premières heures.

L'analyse du cycle cellulaire a également révélé la présence de cellules au contenu 8N et 16N aux différents temps testés. La plus grande proportion, environ 7% de cellules 8N, est observée pour des cellules traitées avec 5 μ M de GlcSph pendant 48h (Figure 51D-F). La morphologie de ces cellules a été également évaluée en immunofluorescence avec un marquage DAPI (noyau) et phalloïdine (actine) (Figure 51G). Ces cellules sont plus grandes et contiennent plusieurs noyaux en « configuration de fleur ». Aucune image de phagocytose ni de fusion cellulaire n'a été observée par ailleurs.

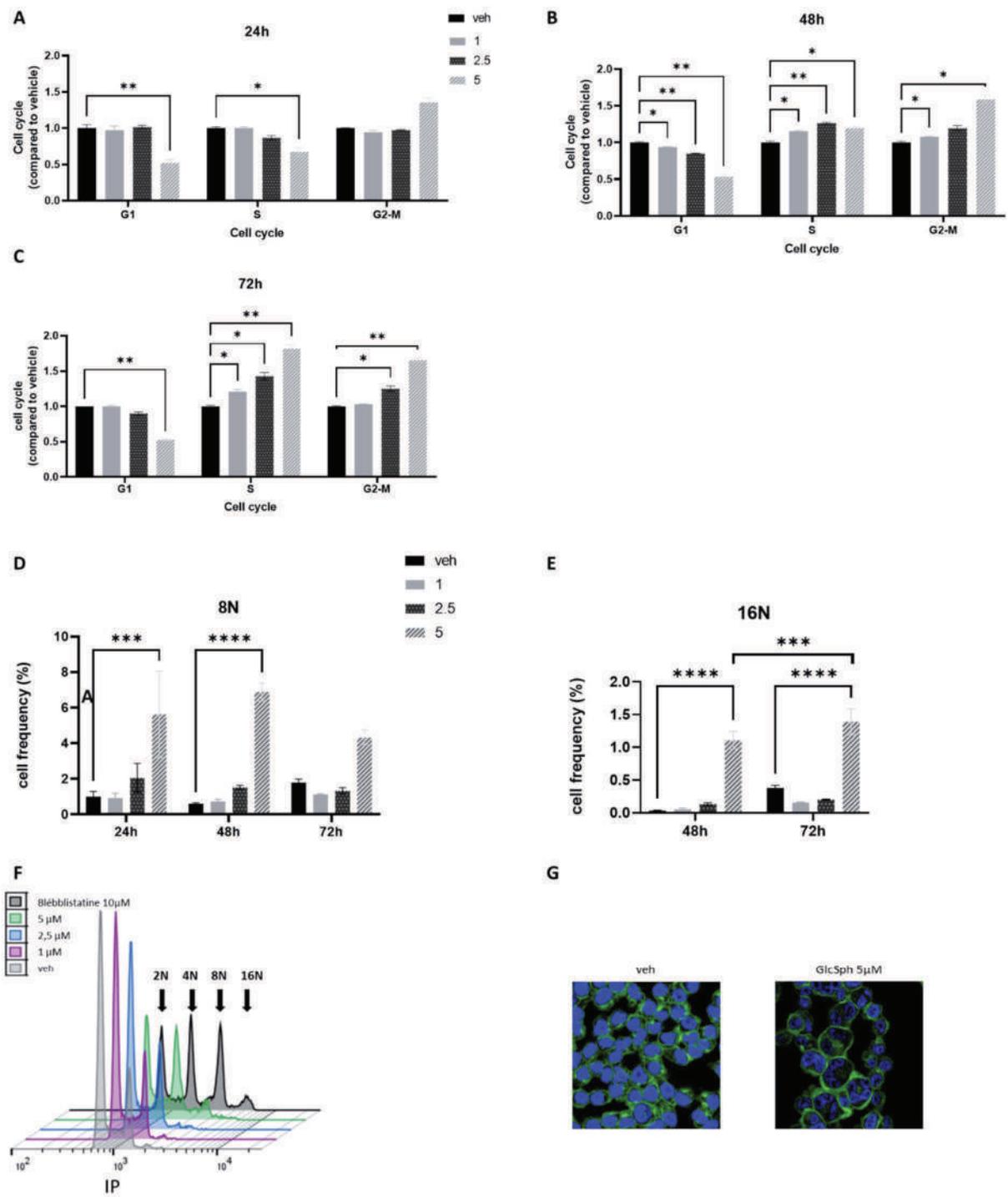


Figure 51. Effet de la GlcSph sur le cycle et la morphologie des cellules de mélanome A375.

Les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de GlcSph (1, 2,5 et 5µM) ou par l'EtOH (veh). **A-C.** Etude du cycle cellulaire des cellules A375 évaluée par le marquage par l'iodure de propidium (IP), des cellules traitées par la GlcSph ou par le véhicule. La proportion des cellules dans les phases G1, S et G2/M a été mesurée à 24h, 48h et 72h et les valeurs obtenues pour les cellules traitées par la GlcSph ont été rapportées à celles des cellules traitées par le véhicule. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes (plus de 20 000 événements ont été acquis et analyses). **D-E.** Proportion des cellules multinucléées 8N et 16N aux différents temps. A 48h, les cellules multinucléées 8N et 16N représentent 6,9% et 1,1%, respectivement, par rapport à

l'ensemble des cellules traitées avec 5µM de GlcSph. **F.** Profil cytométrique montrant la polyploïdie d'un lot d'A375 traitées avec différentes concentrations de GlcSph ou de blébbistatine à 48h. La blébbistatine a été utilisée comme contrôle positif de polyploïdie. **G.** Morphologie cellulaire en immunofluorescence après marquage au DAPI (noyau, bleu) et à la phalloïdine (actine, vert) (grossissement x63). Visualisation au microscope confocal LSM780. Les comparaisons ont été faites en utilisant le test two-way Anova. Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives : *, p<0.05, **, p<0,01, ***, p<0,001, ****, p<0,0001.

G. La glucosylsphingosine diminue la survie des cellules de mélanome privées de sérum

Dans les tumeurs, les cellules tumorales sont exposées à des variations de leur microenvironnement (hypoxie, carence nutritionnelle) auxquelles elles survivent grâce à la mise en place de différents mécanismes de résistance. Dans ce travail, nous avons étudié les effets de l'inhibition de la GCase sur la sensibilité des cellules de mélanome à la déprivation de sérum. Les travaux précédents de l'équipe avaient montré que les cellules A375 transfectées avec le sh1 et le sh2 dirigés contre *GBA* survivaient mieux que les cellules témoins (shCtrl) en condition de privation de sérum ([Astudillo et al., 2016](#)). Dans le but de déterminer si ces effets sont dépendants de la GlcSph, des cellules de mélanome A375 cultivées avec peu (D1, 1% de SVF) ou pas de sérum (D0, 0% de SVF) ont été traitées avec 2,5µM de GlcSph pendant 72h (Figure 52A-C). L'analyse de la viabilité par les tests MTT montre que la GlcSph induit une diminution significative de la survie des cellules cultivées en D1 et D0 comparées aux cellules cultivées en milieu complet (D10, 10% de SVF) (Figure 52A-C). L'ensemble de ces données suggèrent que la survie précédemment observée dans les cellules transfectées par les shARN contre *GBA* est indépendante de la GlcSph.

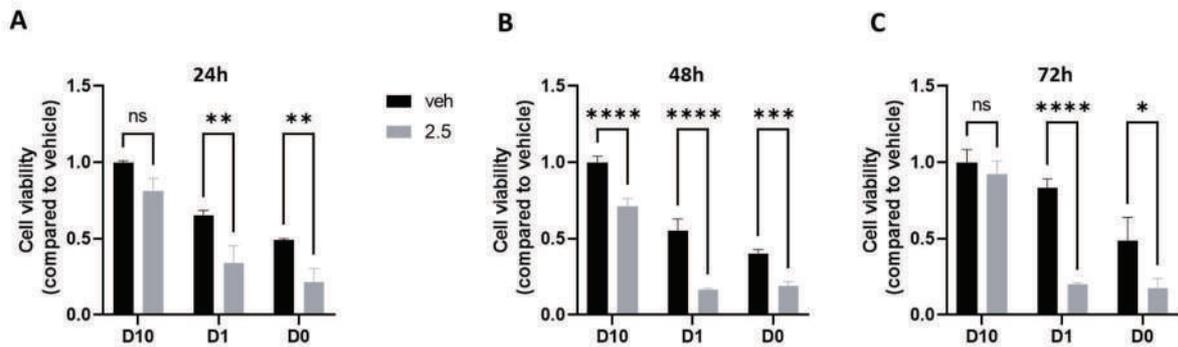


Figure 52. Effet de la GlcSph sur la survie des cellules de mélanome privées ou non de sérum.

Les cellules A375 ont été traitées avec 2,5μM de GlcSph ou avec le véhicule (EtOH) dans du milieu de culture contenant des concentrations variables en SVF (D10, contenant 10% de sérum ; D1, contenant 1% de sérum ou D0, sans sérum). **Etude de la viabilité**, évaluée par le test MTT. La densité optique a été mesurée à 24h (A), 48h (B) et 72h (C) et les valeurs obtenues pour les cellules traitées par la GlcSph ont été rapportées à celles des cellules traitées par le véhicule. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes. Les comparaisons ont été effectuées en utilisant le test two-way Anova avec correction Geisser-Greenhouse. Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives : *, $p < 0.05$, **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$, ****, $p < 0,0001$.

H. La glucosylsphingosine sensibilise les cellules de mélanome au dabrafénib

Une autre caractéristique des cellules tumorales est de développer des résistances aux traitements.

Dans ce travail, nous avons étudié les effets de l'inhibition de la GCCase sur la sensibilité des cellules de mélanome aux thérapies ciblées, notamment au dabrafénib (un BRAFi). Pour cela, la réponse au dabrafénib a été évaluée par des tests MTT sur les cellules A375 qui présentent la mutation BRAF^{V600E}.

Les résultats montrent une diminution dose dépendante de la viabilité des cellules A375 traitées par le dabrafénib pendant 48h. Par contre, l'inhibition de la GCCase par shARN dans ces cellules n'augmente pas leur sensibilité vis-à-vis de cette drogue (Figure 53A). A l'inverse, l'inhibition par le CBE entraîne une diminution significative de la viabilité des cellules traitées par dabrafénib à 24h par rapport aux cellules traitées uniquement par le dabrafénib (Figure 53B). Cette diminution n'est plus observée à 48h. Il est important de noter que le traitement par le CBE est associé à une augmentation des taux cellulaires de la GlcSph d'environ 40 fois (Figure 47E) alors qu'aucune augmentation significative n'est retrouvée dans les cellules transfectées avec les sh dirigés contre *GBA* (Figure 47C), suggérant que les

taux cellulaires de GlcSph pourraient être associés aux effets observés. Dans le but d'étudier cette hypothèse, les cellules ont été directement traitées avec de la GlcSph exogène. Le traitement par la GlcSph (2,5µM) entraîne une diminution significative de la viabilité des cellules traitées par le dabrafénib à 24h par rapport aux cellules traitées uniquement par le dabrafénib (Figure 53C) mais cette diminution est probablement due à l'effet seul de la GlcSph puisqu'aucune différence n'est observée entre les cellules traitées par la GlcSph seule et celles traitées par la combinaison des deux molécules. De manière intéressante, après 48h de traitement, la viabilité des cellules doublement traitées (Dabrafénib et GlcSph) est plus faible que celle des cellules traitées uniquement par le dabrafénib ou par la GlcSph (Figure 53C), démontrant le potentiel effet sensibilisant de la GlcSph vis-à-vis du dabrafénib.

Enfin d'évaluer si les effets observés dans les cellules traitées au CBE et au dabrafénib (Figure 53B) étaient dus à une accumulation de GlcSph secondaire à une métabolisation du GlcCer par la ACDase, nous avons réalisé une pré-incubation de 24h des cellules avec le carmofur, un inhibiteur de cette enzyme. Les résultats montrent que le carmofur semble abolir les effets sensibilisant du CBE sur le dabrafénib ($p=0.0533$) après 24 heures de traitement (Figure 53D). Ces données suggèrent que la sensibilisation des cellules de mélanome au dabrafénib induite par le CBE pourrait être due à l'accumulation de GlcSph formée *via* la transformation du GlcCer par la ACDase. Cependant, l'effet inhibiteur du carmofur sur la ACDase reste à démontrer dans ce modèle cellulaire, ainsi que sur les taux cellulaires de GlcCer et de GlcSph.

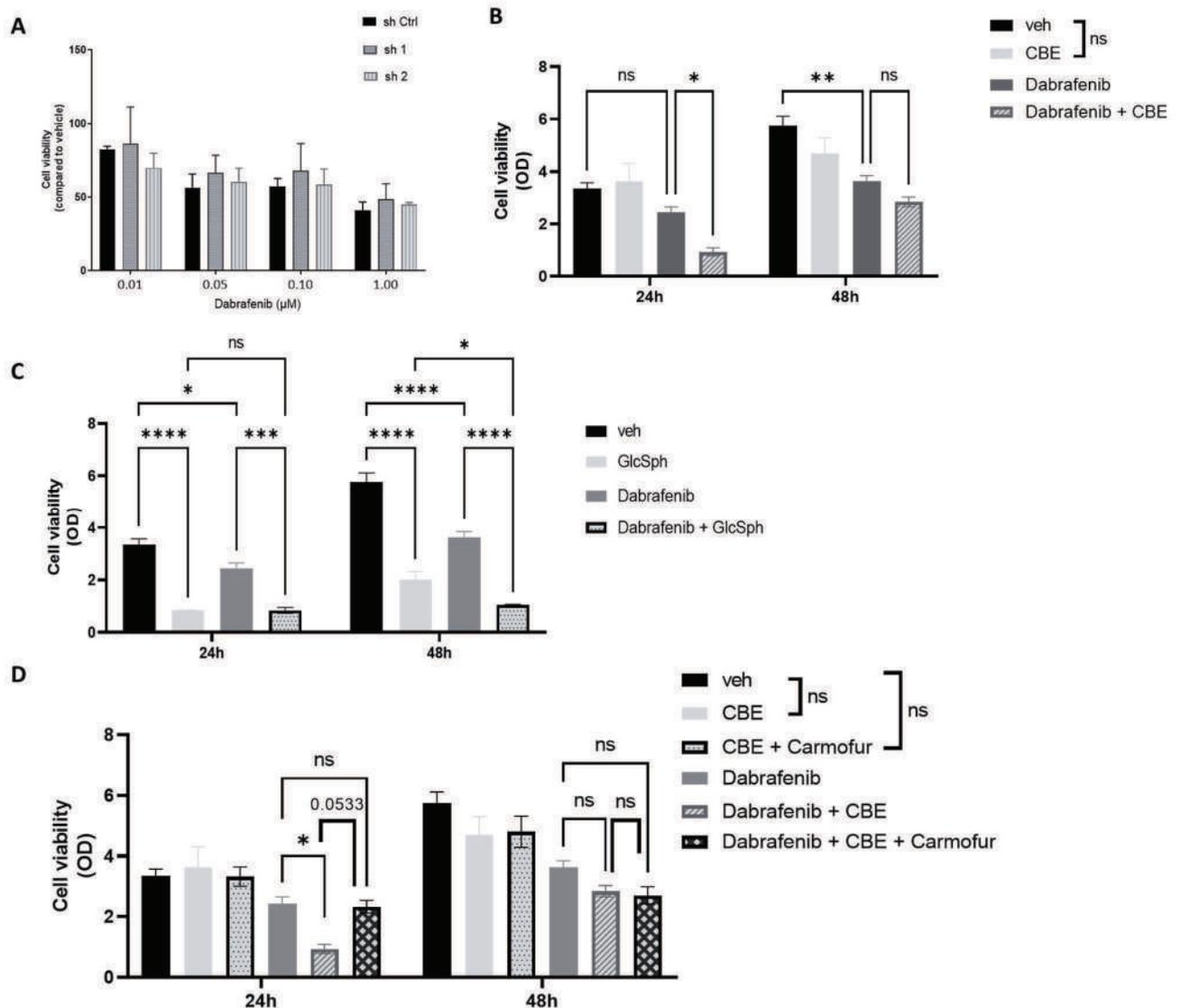


Figure 53. Impact de l'inhibition de la GCase sur la sensibilité des cellules de mélanome humain A375 au dabrafénib.

A. Les cellules A375 transfectées par des shARN contre *GBA* ont été traitées avec des concentrations variables de dabrafénib ou avec l'EtOH (veh) pendant 48h. Etude de la viabilité, évaluée par le test MTT. La densité optique a été mesurée à 48h et les valeurs obtenues pour les cellules traitées par la GlcSph ont été rapportées à celles des cellules traitées par le véhicule. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM de 2 expériences indépendantes. **B-D.** Les cellules A375 ont été pré-incubées pendant 24h avec le CBE à 30 μM (**B et D**), la GlcSph à 2,5 μM (**C**) ou le carmofur à 50 μM (**D**) puis traitées avec le dabrafénib 1 μM pendant 48h. La viabilité des cellules A375, mesurée par le test MTT, a été exprimée en moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes. Les comparaisons ont été faites en utilisant le test two-way Anova. Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives : *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$, ****, $p < 0,0001$. ns, non significatif.

- I. Les effets induits par la glucosylsphingosine sont dépendants de sa concentration cellulaire

L'ensemble de nos résultats montrent que les cellules de mélanome traitées directement avec de la GlcSph exogène présentent des caractéristiques, parmi lesquelles la diminution de la croissance cellulaire *in vitro* et la génération de cellules multinucléées, différentes des cellules dont la GCCase a été inhibée par shARN ou par CBE. Pour déterminer si ces différences pourraient être en lien avec la composition en SL, une analyse globale de l'ensemble des SL intracellulaires et associés aux membranes a été réalisée par spectrométrie de masse.

L'analyse des SL des cellules traitées par la GlcSph (2,5 et 5 μ M) pendant 24h montre une très forte augmentation du taux de GlcSph (1,6 et 4,1 nmol/mg de protéines, respectivement) par rapport aux cellules non traitées (environ 0,11 pmol/mg de protéines) (Figure 54A). Ce taux de GlcSph est également plus important que celui mesuré dans les cellules traitées par CBE pendant 48h (4,57 pmol/mg de protéines) (Figure 47C). La proportion de GlcSph qui est retrouvée associée aux cellules après l'ajout de ce lyso-SL dans le milieu extracellulaire, est d'environ 10%, indiquant que 90% de la GlcSph ajoutée n'a pas été captée par les cellules (ce qui est le plus probable) ou bien a été métabolisée. Sur ce dernier point, nos résultats montrent que le taux de So est significativement plus élevé dans les cellules traitées par la GlcSph exogène par rapport à celles traitées avec le véhicule mais sans différence entre les concentrations 2,5 et 5 μ M (Figure 54A). Cela pourrait indiquer qu'une partie de la GlcSph a été catabolisée en So (peut-être par la GCCase, avec une capacité maximale) et qu'une autre partie de la GlcSph est restée adsorbée aux membranes, ou s'est localisée dans un autre compartiment cellulaire sans dégradation. Le taux de So n'est pas modifié dans les cellules traitées par le CBE ou celles transfectées par les sh dirigés contre *GBA* (Figure 54B). Aucune modification significative n'a été observée pour le Cer ou les autres SL étudiés dans les cellules traitées avec la GlcSph (Figure 55A) ou celles dans lesquelles la GCCase a été inhibée par shARN ou par CBE (Figure 55B et C).

Ces résultats montrent que le traitement des cellules par la GlcSph modifie le métabolisme des SL, ce qui n'est pas retrouvé lorsque la GCCase a été inhibée par shARN ou par CBE. Le taux très élevé de GlcSph ainsi que le taux élevé de So pourraient donc expliquer les effets cellulaires précédemment décrits.

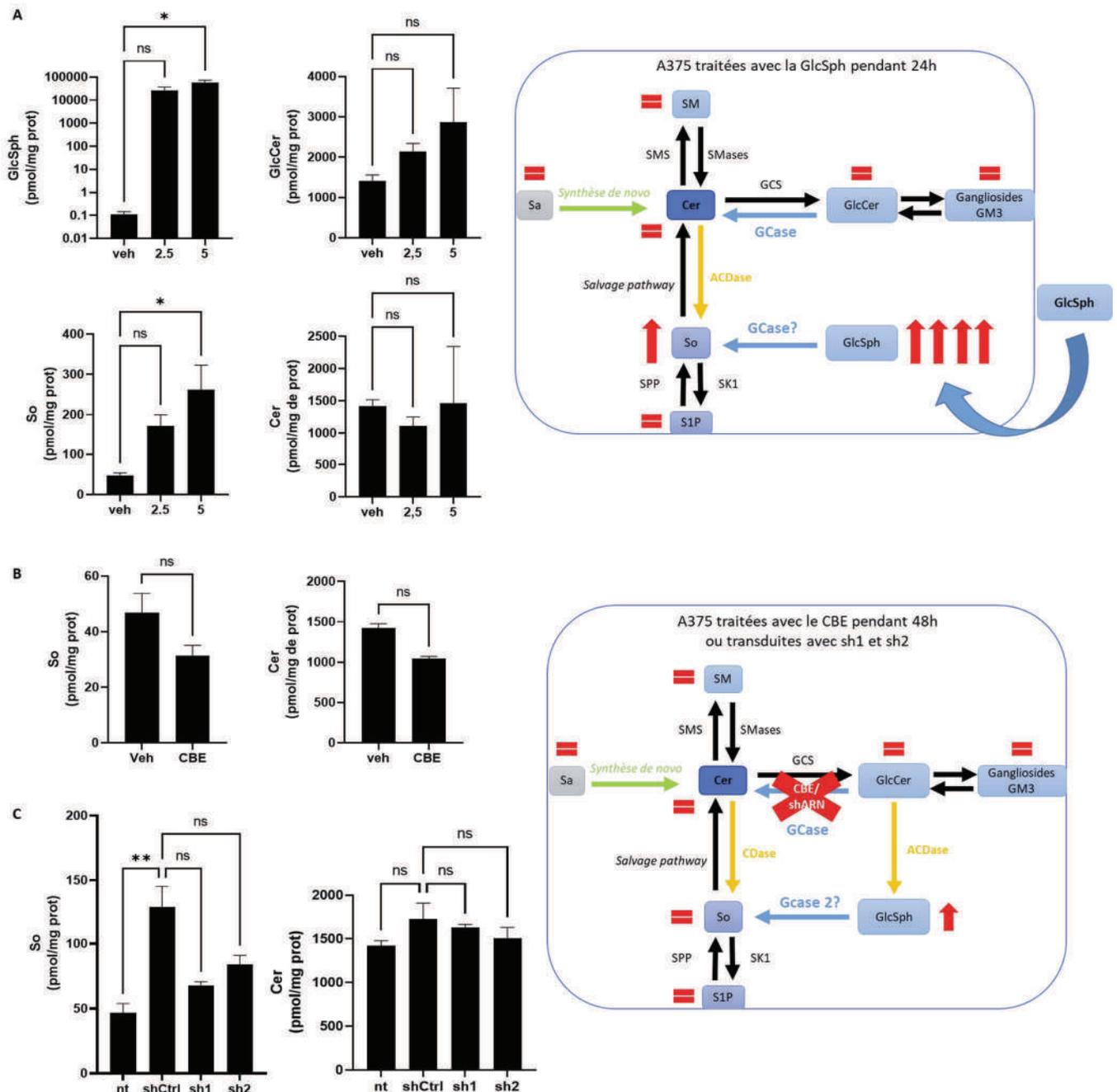


Figure 54: Analyse des SL dans les différents modèles cellulaires étudiés.

Analyse sphingolipidomique par spectrométrie de masse des cellules traitées par GlcSph à 2,5 et 5μM pendant 24h (A), des cellules traitées par CBE 30μM pendant 48h (B) des cellules transfectées par le

shCtrl, le sh1 ou le sh2 (C). Les valeurs obtenues ont été rapportées au véhicule (A et B) ou au shCtrl (C). Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes. Les comparaisons des données ont été faites en utilisant les tests de Kruskal-Wallis pour A et C, et le test Mann-Whitney pour B. Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives : *, p<0.05, **, p<0,01. ns, non significatif.

Représentation graphique du métabolisme de la GlcSph dans les différents modèles utilisés, à partir des résultats des dosages des SL.

GlcSph, glucosylsphingosine; GlcCer, glucosylcéramide ; Cer, céramide; So, sphingosine ; S1P, sphingosine-1-phosphate ; Sa, sphinganine ; SM, sphingomyéline ; SMS, sphingomyéline synthase ; SMase, sphingomyélinase; GCS, glucosylcéramide synthase; (A)CDase, céramidase (acide) ; GCase, glucosylcéramidase ; SK1, sphingosine kinase 1 ; SPP, sphingosine-1-phosphate phosphatase.

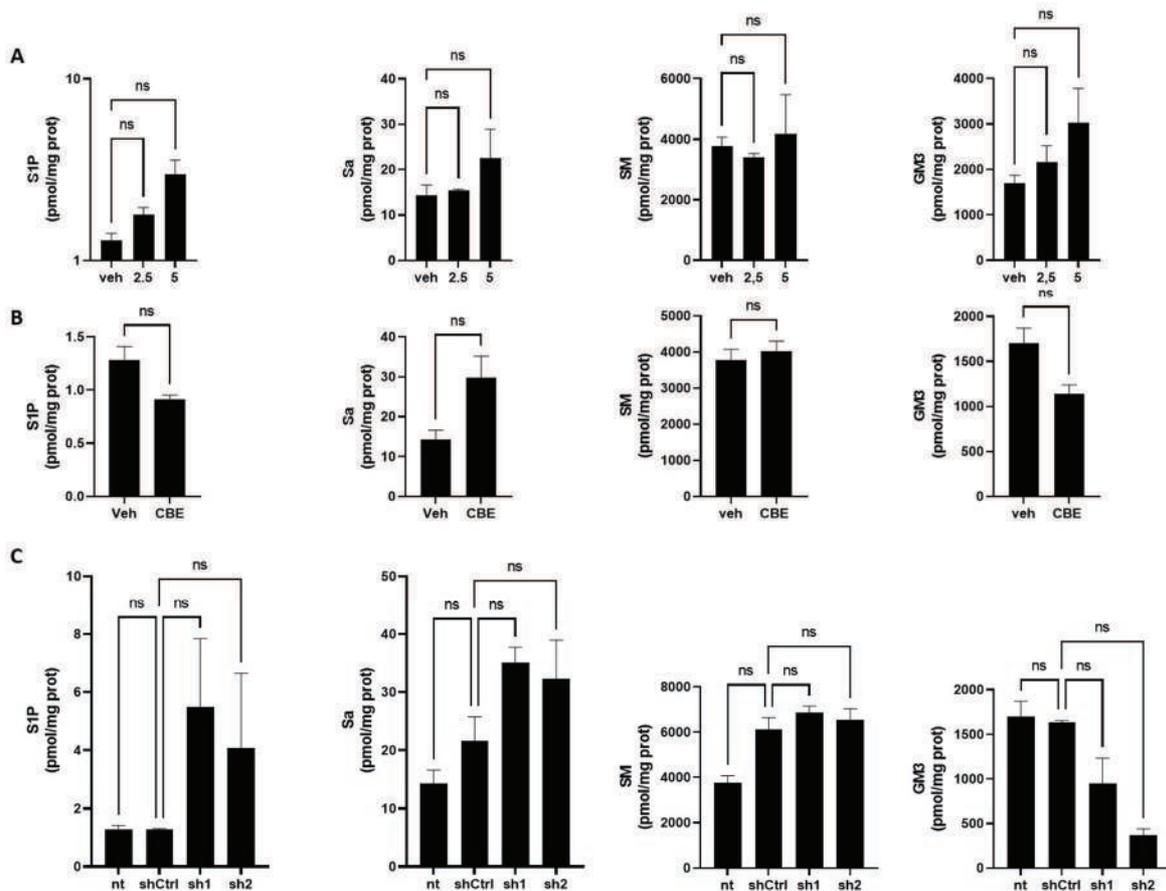


Figure 55. Analyse sphingolipidomique (suite).

Analyse sphingolipidomique par spectrométrie de masse des cellules traitées par GlcSph à 2,5 et 5μM pendant 24h (A), des cellules traitées par CBE 30μM pendant 48h (B) des cellules transfectées par le shCtrl, le sh1 ou le sh2 (C). Les valeurs obtenues ont été rapportées au véhicule (A et B) ou au shCtrl (C). Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes. Les comparaisons des données ont été faites en utilisant les tests de Kruskal-Wallis. ns, non significatif. S1P, sphingosine-1-phosphate; Sa, sphinganine; SM, sphingomyéline.

J. Les effets anti-prolifératifs induits par la glucosylsphingosine ne sont pas dépendants de la glucosylcéramidase

Les expériences précédentes ont montré que l'effet de la GlcSph sur la croissance cellulaire semble limité dans le temps, suggérant un possible catabolisme de la molécule, conforté par l'élévation du taux cellulaire de So. Pour tester cette hypothèse, les cellules de mélanome ont été traitées une seule fois ou tous les jours avec différentes concentrations de GlcSph, puis la croissance cellulaire a été mesurée (Figure 56A). Les résultats montrent que la croissance des cellules traitées quotidiennement avec les concentrations 1 et 2,5 μ M est la même que celle des cellules traitées une seule fois. A l'inverse, pour la concentration 5 μ M, on observe que l'apport quotidien de GlcSph induit une diminution significative de la croissance cellulaire à 96h comparées aux cellules pour lesquelles le traitement n'a pas été renouvelé (Figure 56A). Ces données suggèrent que la GlcSph pourrait être transformée au cours du temps et donc n'aurait plus d'effet sur la croissance. Pour déterminer si la GCCase pourrait être responsable de ce phénomène, les cellules A375, dans lesquelles l'activité de la GCCase était inhibée par le CBE, ont été traitées par la GlcSph à 5 μ M (Figure 56B). Les résultats montrent que l'inhibition de la GCCase n'a pas majoré l'effet de la GlcSph indiquant que la GCCase lysosomale n'intervient pas dans le catabolisme de la GlcSph.

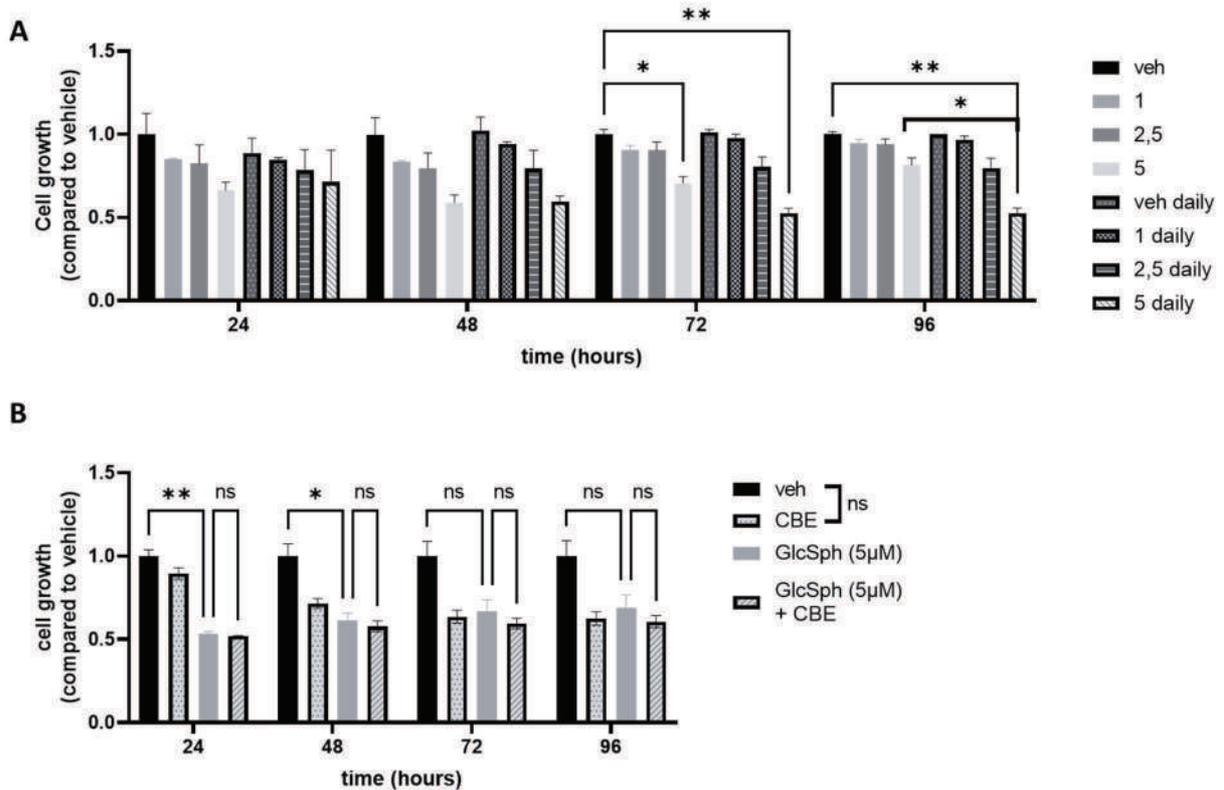


Figure 56. Rôle de la GCCase dans le métabolisme de la GlcSph dans les cellules de mélanome A375.

A. Les cellules A375 ont été traitées avec différentes concentrations de GlcSph (1, 2,5 et 5µM) ou par l'éthanol (veh), une seule fois ou tous les jours (daily). La croissance des cellules A375 a été évaluée par la mesure de la confluence par l'automate Incucyte. La confluence a été mesurée toutes les 24h pendant 96h et les valeurs obtenues pour les cellules traitées par la GlcSph ont été rapportées à celles des cellules traitées par le véhicule. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes. **B.** Les cellules A375 ont été traitées par le CBE à 30µM et par la GlcSph à 5 µM. La croissance des cellules A375 a été évaluée par la mesure de la confluence par l'automate Incucyte. La confluence a été mesurée toutes les 24h pendant 96h et les valeurs obtenues pour les cellules traitées par la GlcSph ont été rapportées à celles des cellules traitées par le véhicule. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes. Les comparaisons ont été faites en utilisant le test two-way Anova avec correction Geisser-Greenhouse. Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives : *, p<0.05, **, p<0,01.

Matériel et méthodes 2^{ème} partie

A. Cellules

Les cellules ont été cultivées dans du DMEM à 4,5 g/L de glucose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Life Technologies) pour les cellules de mélanome humain A375 et les fibroblastes ou dans du RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Life Technologies) pour les cellules Jurkat (cellules lymphoblastoïdes T), à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂, milieu enrichi avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté et contenant le mélange pénicilline/streptomycine (100 UI/ml).

B. Transfection cellulaire et expression de *SNCA* sauvage ou muté

Le plasmide pcDNA3.1(+) contenant le cDNA codant pour la séquence humaine de *SNCA* sauvage (WT) ou mutée (p.A53T) a été créé et fourni par Genscript®. La lignée A375 a été transfectée par le plasmide vide (EV) ou contenant le cDNA WT ou muté par la Lipofectamine 2000 (Invitrogen®). Au bout de 48h, les cellules ont été cultivées en présence de G418 (génélicine ; Sigma-Aldrich) à la concentration initiale de 1,5 mg/ml puis 500µg/ml. L'expression de l'alpha-synucléine a été vérifiée par Western Blot.

C. Western Blot

Après incubation avec les réactifs indiqués, les cellules ont été récoltées par trypsinisation. Les culots cellulaires ont été resuspendus dans un tampon de lyse contenant des antiprotéases, soniqués et centrifugés à 4°C pendant 10 min à 14000g. La concentration en protéines a été déterminée selon la méthode de Bradford ([Bradford, 1976](#)). Les extraits protéiques (40µg) ont été ensuite soumis à la séparation électrophorétique dans un gel dénaturant de polyacrylamide/pré-coulé Biorad. Après transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose, la membrane a été saturée pendant 1h avec une solution Tris-buffered saline (TBS) contenant 0,1% de Tween-20 (TBST) et 5% de lait écrémé. L'alpha-synucléine a été détectée en utilisant l'un ou l'autre des anticorps monoclonaux de souris

suivants: le clone 4D6 (Abcam, référence: ab1903) ou le clone syn211 (Abcam, référence: ab80627), après dilution au 1/1000 dans du TBST 1% lait écrémé. Un anticorps de lapin anti- β -actine a été utilisé pour un contrôle de charge. Après lavage, les membranes ont été incubées pendant 2h à température ambiante avec un anticorps secondaire, couplé à la peroxydase, de souris ou de lapin, dilué au 1/1000 pour l' α -synucléine et au 1/5000 pour l'actine. La révélation des membranes a été faite après ajout du substrat chimiluminescent (ECL, Pierce®) grâce au système Chemidoc (Biorad). Les bandes ont été quantifiées par le logiciel ImageLab (Biorad).

Résultats expérimentaux (2^{ème} partie)

Dans cette 2^{ème} partie, nous avons étudié l'expression de l'alpha-synucléine dans les cellules de mélanome qui pourrait contribuer à la tumorigenèse (cf. Partie II.C.4) et qui pourrait être affectée par l'inhibition de la GCCase. En raison des différentes conformations de l'alpha-synucléine (monomérique et oligomérique), l'expression de cette dernière a été analysée à l'aide de 2 anticorps différents, le clone 4D6, décrit pour révéler les formes monomériques, et le clone syn211, qui permettrait de détecter les formes monomériques et oligomériques ([Kumar et al., 2020](#)).

A. L'inhibition de la glucosylcéramidase par le CBE ne semble pas altérer l'expression de l'alpha-synucléine dans les cellules de mélanome.

Dans un premier temps, l'expression de l'alpha-synucléine a été évaluée dans des cellules de mélanome A375 dans lesquelles la GCCase a été inhibée par shARN ou par le CBE. Dans ce modèle cellulaire, les résultats n'ont pas été concluants, probablement en raison d'une expression basale trop faible de l'alpha-synucléine (résultats non montrés). Pour aller plus loin dans l'exploration de nos hypothèses, nous avons généré des cellules de mélanome surexprimant l'alpha-synucléine normale ou pathologique. Dans ce but, des cellules de mélanome A375 ont été transfectées ou non par un plasmide contenant la séquence sauvage (WT) ou mutée (A53T) du cDNA du gène *SNCA* codant pour l'alpha-synucléine humaine. Comme le montre la Figure 57, l'expression de la forme monomérique (18kDa) est nettement augmentée dans les cellules transfectées avec la construction sauvage ou la construction mutée par rapport aux cellules non transfectées ou transfectées avec le plasmide vide, ce qui valide la transfection (Figure 57). Alors que la mutation p.A53T est décrite pour engendrer la formation des agrégats d'alpha-synucléine, aucune forme oligomérique n'a été observée que ce soit avec l'anticorps 4D6 ou le syn211. En effet, les bandes de haut poids moléculaire observées (>70kDa) sont très probablement non spécifiques car présentes dans les fibroblastes qui n'expriment pas l'alpha-synucléine (Figure 57) ([Kim et al., 2018](#)).

Les cellules de mélanome modifiées ou non pour SNCA ont ensuite été traitées par le CBE (30µM) ou par le véhicule (DMSO) pendant 48h. Dans les cellules surexprimant la forme sauvage ou mutée de l'alpha-synucléine, le traitement par CBE ne semble pas modifier l'expression de la forme monomérique observée avec le clone 4D6 alors que l'expression semble être augmentée avec le clone syn211 par rapport aux cellules traitées par le véhicule. Aucune forme oligomérique n'est observée dans les conditions testées (Figure 57).

Ainsi, au regard de ces résultats préliminaires et en partie discordants, il est impossible de conclure à une modification de l'expression de l'alpha-synucléine après traitement par le CBE.

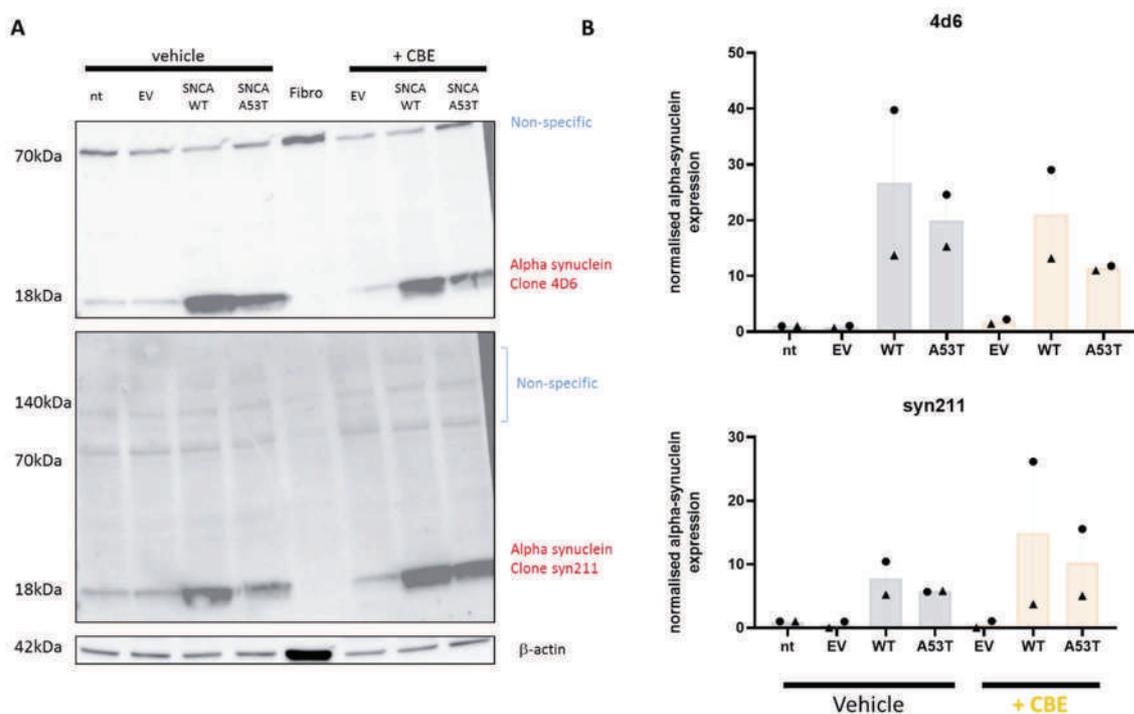


Figure 57. Effet du CBE sur l'expression de l'alpha-synucléine dans les cellules de mélanome A375.

Des cellules A375 ont été transfectées ou non (nt) avec le plasmide pcDNA3.1(+) vide (EV) ou contenant le cDNA de SNCA sauvage (WT) ou muté (A53T). **A.** Etude de l'expression de l'alpha-synucléine dans les cellules traitées ou non par CBE 30µM pendant 48h par Western Blot en utilisant l'anticorps 4D6 (image supérieure) ou le clone syn211 (image inférieure). L'expression de l'alpha-synucléine a également été étudiée dans des fibroblastes (Fibro) considérés comme témoin négatif, n'exprimant pas l'alpha-synucléine. **B.** Quantification de l'expression de l'alpha-synucléine normalisée par rapport à celle de l'actine, par le logiciel ImageLab. Les résultats représentent la moyenne de 2 expériences indépendantes ; chaque expérience étant représentée par un symbole différent.

B. La glucosylsphingosine augmenterait l'expression de l'alpha-synucléine mutante dans les cellules de mélanome.

Afin d'évaluer les effets de la GlcSph sur l'expression de l'alpha-synucléine, les cellules ont été traitées par la GlcSph (5µM) ou par le véhicule (EtOH) pendant 48h. Dans les cellules surexprimant la forme sauvage, le traitement par la GlcSph ne semble pas modifier l'expression de la forme monomérique en utilisant le clone syn211 alors qu'elle semble être augmentée avec le clone 4D6 par rapport aux cellules traitées par le véhicule (Figure 58). De même, dans les cellules surexprimant la forme mutée, le traitement par GlcSph semble augmenter l'expression de la forme monomérique observée avec les 2 anticorps par rapport aux cellules traitées par le véhicule (Figure 58). Aucune forme oligomérique n'est observée dans les conditions testées. L'ensemble de ces résultats suggèrent une augmentation de l'expression de la forme monomérique de l'alpha-synucléine mutante dans les cellules traitées par GlcSph.

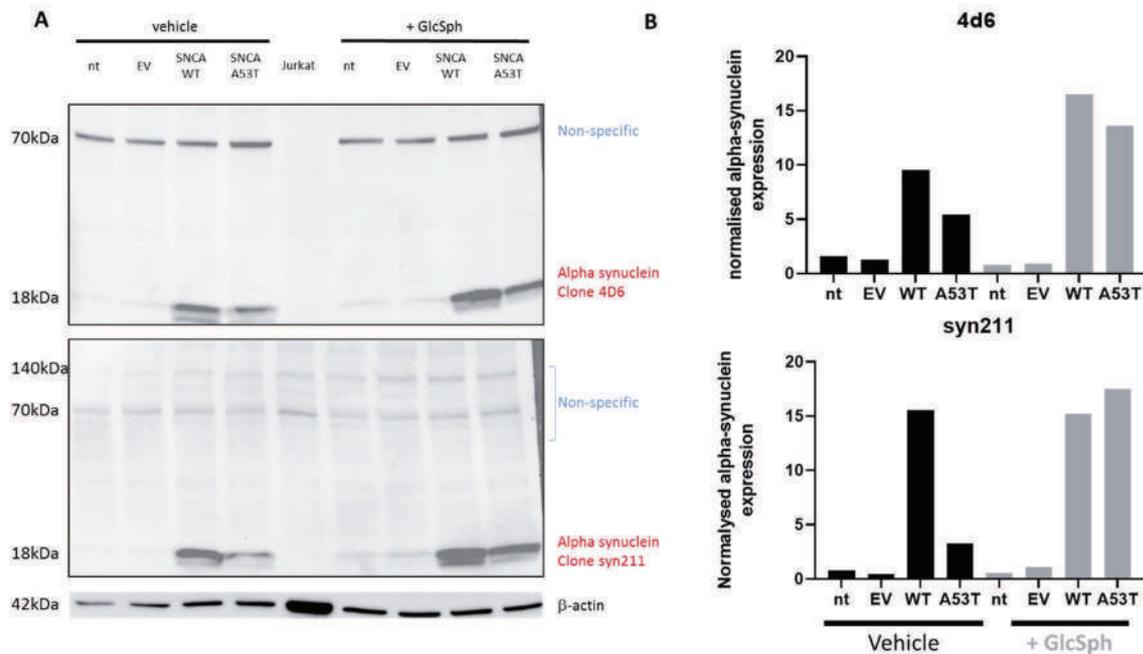


Figure 58. Effet de la GlcSph sur l'expression de l'alpha-synucléine dans les cellules de mélanome A375

Des cellules A375 ont été transfectées ou non (nt) avec le plasmide vide (EV) ou contenant le cDNA de SNCA sauvage (WT) ou muté (A53T). **A.** Etude de l'expression de l'alpha-synucléine dans les cellules surexprimant l'alpha-synucléine sauvage ou mutée traitées ou non par GlcSph 5µM pendant 48h par

Western Blot en utilisant le clone 4D6 (partie supérieure) ou le clone syn211 (partie inférieure). L'expression de l'alpha-synucléine a également été étudiée dans des cellules Jurkat considérées comme témoin négatif, n'exprimant pas l'alpha-synucléine. **B.** Quantification de l'expression de l'alpha-synucléine normalisée par rapport à celle de l'actine, par le logiciel ImageLab. Les histogrammes noirs représentent la condition traitée par le véhicule et les histogrammes gris, la condition traitée par la GlcSph. Les résultats sont ceux d'une seule expérience.

Discussion

I. Glucosylcéramidase, glucosylsphingosine et mélanome

Dans un travail co-signé par notre collègue le Dr Leonardo Astudillo ([Dubot et al., 2020](#)) et dont la partie expérimentale avait été réalisée par L. Astudillo et N. Therville, l'impact du déficit de la GCCase sur la progression du mélanome a été étudié sur deux modèles murins de maladie de Gaucher, D409V/D409V et D409V/null ([Astudillo, 2016](#)). Ces modèles élaborés par l'équipe du Dr Grabowski ([Xu et al., 2003](#)) portent la mutation ponctuelle D409V (actuellement dénommée p.D448V), décrite à l'état hétérozygote chez l'homme. Une augmentation de la croissance tumorale a été observée chez les souris atteintes par rapport aux animaux hétérozygotes ou sauvages. L'analyse immunologique des infiltrats immunitaires dans le foie, la rate, le thymus et les tumeurs n'a révélé aucune différence permettant d'expliquer l'augmentation de la croissance ([Astudillo, 2016](#)). L'analyse des lipides dans le foie et la rate des animaux a permis de révéler une augmentation de GlcCer (environ 2 fois par rapport aux souris hétérozygotes), ce qui est comparable à ce qui a été publié (entre 2 et 4 fois par rapport aux souris sauvages) ([Xu et al., 2003](#)). De plus, une augmentation de la concentration en GlcSph a été retrouvée (5 à 6 fois par rapport aux souris hétérozygotes), ce qui est également décrit dans la littérature ([Sun et al., 2013](#)). Ces observations décrivent pour la première fois la croissance de mélanome B16 dans ces modèles murins. L'augmentation du GlcCer et de la GlcSph nous a amenés à nous interroger sur leur rôle possible dans la progression tumorale.

L'essentiel de mes travaux de thèse a été d'étudier le rôle de la GCCase et de ses substrats dans le mélanome. Pour cela, nous avons utilisé plusieurs modèles cellulaires de mélanome humain A375 dont l'expression et/ou l'activité de la GCCase ont été modifiées (shARN, CBE ou surexpression de GCCase sauvage et mutées) et des cellules de mélanome humain directement traitées par la GlcSph.

A. Relation entre expression et activité de la glucosylcéramidase et progression du mélanome

En raison du peu de données sur l'expression de la GCCase décrites dans le mélanome, nous avons tout d'abord comparé l'expression génique de *GBA*, issue de l'analyse transcriptomique de cohortes de tumeurs de mélanome primaire ou métastatique avec l'expression protéique de la GCCase dans nos lignées disponibles au laboratoire. Nos résultats ont révélé que l'activité de la GCCase des cellules de mélanome semblait diminuer avec le stade du mélanome alors que l'analyse bioinformatique montrait une augmentation de l'expression de *GBA*. Ces résultats suggèrent une modification post-transcriptionnelle/post-traductionnelle de la GCCase. La glycosylation, notamment sur le résidu N58, est la modification post-traductionnelle de la GCCase nécessaire à son activité catalytique (cf. Partie I.A.3). Cependant, aucune altération post-traductionnelle de la GCCase n'a été décrite. La protéine pourrait être dégradée ou localisée en dehors du lysosome, ainsi l'étude de son expression par Western Blot en présence ou non d'un inhibiteur de protéasome, de sa glycosylation ainsi que l'étude de sa localisation subcellulaire par immunofluorescence seraient intéressantes pour explorer ces hypothèses. Un autre mécanisme en jeu pourrait être une altération du transporteur protéique de la GCCase, LIMP2, ou de son activateur, la saposine C. De plus, la transcription accrue de *GBA* pourrait suggérer une activation du facteur de transcription TFEB. Il aurait été intéressant de vérifier dans nos lignées cellulaires l'augmentation des transcrits de *GBA* ainsi que l'état d'activation de TFEB *via* sa localisation (inactif si cytoplasmique ou actif si nucléaire). Cependant, le résultat de l'analyse des transcrits faite à partir des banques de données est à nuancer car elle a été réalisée sur des tumeurs de mélanome humain, comprenant plusieurs types cellulaires (comme les kératinocytes et les cellules immunitaires). D'autre part, l'activité de la GCCase n'a été déterminée que sur un nombre relativement restreint de lignées cellulaires de mélanome.

B. Modèles cellulaires d'inhibition de la glucosylcéramidase

Pour étudier le rôle de la GCase nous avons utilisé des cellules de mélanome humain métastatique A375 dans lesquelles la GCase a été inhibée par ARN interférence (shARN) ou par inhibition pharmacologique (CBE). Les shARN ont permis de diminuer de manière importante l'expression et l'activité de la GCase. De même, le traitement des cellules par le CBE a permis de diminuer significativement l'activité de la GCase. L'analyse des SL dans ces modèles n'a révélé aucune augmentation du taux de GlcCer mais seulement une augmentation de la GlcSph, qui est probablement secondaire à la transformation du GlcCer en GlcSph par la ACDase ([Ferraz et al., 2016](#)). Il est important de noter que le taux de GlcSph augmente dans les cellules exprimant un shARN dirigé contre *GBA* (x6 et x4, respectivement pour sh1 et sh2) par rapport aux cellules non transfectées mais que cette augmentation est non significative et (étonnement) plus faible que celle mesurée dans les cellules exprimant le shCtrl (x20). Cependant, le taux moyen de la GlcSph dans les cellules shCtrl (2,29 pmol/mg de prot) reste inférieur au taux retrouvé dans les cellules traitées par le CBE (4,57 pmol/mg de prot). Toutefois, le choix de ce contrôle ne semble rétrospectivement pas être optimal (il aurait fallu tester aussi des cellules transfectées avec des sh dirigés contre une autre protéine ou des sh « *scrambled* »). C'est pourquoi dans la mesure du possible, l'analyse des cellules sh1 et sh2 a été conduite par rapport aux shCtrl et aux cellules non transfectées.

Dans les cellules traitées par le CBE à 30 μ M pendant 48h, seule une augmentation significative du contenu en GlcSph est retrouvée (x 40, soit 4,57 pmol/mg de prot). Ce résultat est proche de celui décrit dans les fibroblastes de patients Gaucher (environ 1 pmol/mg de prot) ([Ferraz et al., 2016](#)). Cependant, l'absence d'augmentation de GlcCer peut représenter une limite quant à la validation de ce modèle. L'augmentation de la durée d'incubation ou de la dose de CBE serait peut-être plus judicieuse. Par exemple, dans des fibroblastes, le traitement avec le CBE à 300 μ M pendant 5 jours retrouve une nette augmentation (100 pmol/mg de prot) ([Ferraz et al., 2016](#)). Il est donc probable que le taux de GlcSph dépende du type cellulaire (donc de l'équilibre entre apports, biosynthèse et

dégradation des SL), de la dose et de la durée d'incubation avec le CBE. Une étude sur les effets-doses du CBE (de 0.1µM à 10mM) pendant 24h réalisée sur des cellules HEK293T et sur des fibroblastes a montré qu'à partir d'environ 1µM et jusqu'à 300µM le CBE inhibait spécifiquement la GCCase lysosomale sans effet sur les autres enzymes lysosomales testées, notamment la GCCase 2 ([Kuo et al., 2019](#)).

Toutefois, dans la maladie de Gaucher, le macrophage (hépatique, splénique, médullaire) est probablement la source la plus importante de GlcSph, en raison de ses fonctions de phagocytose (donc avec des apports considérables de glycolipides). Dans la peau, des macrophages locaux pourraient aussi être la source de la GlcSph qui agirait de manière locale et exocrine sur les cellules de mélanome voisines. Cette hypothèse est confortée par les concentrations importantes de GlcSph dans l'épiderme de souris Gaucher (D409V ;C* et N409S) par rapport aux souris sauvages ([Liou et al., 2019](#)). De plus, une GlcCer déacylase a été identifiée dans l'épiderme, qui permettrait de générer de la GlcSph à partir du GlcCer produit par les kératinocytes ([Ishibashi et al., 2013](#)). Le déficit en GCCase pourrait donc augmenter la production épidermique de GlcSph. C'est pourquoi nous avons également traité les cellules de mélanome avec de la GlcSph.

C. La glucosylsphingosine diminue la croissance *in vitro* des cellules de mélanome

Nous avons montré que la GlcSph entraînait une diminution de la croissance des cellules de mélanome humain A375 et WM35. Un effet cytotoxique de la GlcSph a été décrit sur les globules rouges ([Taketomi et al., 1976](#)), sur des cellules de mélanome murin (B16/F10) ([Atsumi et al., 1993](#)) et sur des cellules neuronales cholinergiques (LA-N-2) ([Schueler et al., 2003](#)). Cependant, les doses testées dans ces expériences étaient très fortes (de 50 à 100µM). Bien qu'il semble y avoir une sensibilité différente selon le type cellulaire, nous avons choisi de traiter les cellules de mélanome avec des concentrations de GlcSph allant de 1 à 5µM. Ces concentrations sembleraient plus proches des taux plasmatiques de

GlcSph retrouvés chez les patients Gaucher ([Chipeaux et al., 2017](#); [Pettazzoni et al., 2017](#)). A ces concentrations, nos résultats montrent que les effets de la GlcSph sont transitoires dans les cellules de mélanome. Une diminution de la viabilité cellulaire, également transitoire, a été observée dans des cellules neuronales cholinergiques (LA-N-2) ([Schueler et al., 2003](#)) ainsi que dans des cellules de myélome (NCI-H929) ([Reed et al., 2018](#)) traitées avec de la GlcSph (1 et 5 μ M).

De manière intéressante, il a été décrit qu'un autre lysoSL, la psychosine ou galactosylsphingosine (GalSph), pouvait altérer la croissance cellulaire. La GlcSph et la psychosine sont très proches structuralement puisque seul le sucre est différent. La concentration de psychosine est augmentée dans une autre maladie lysosomale autosomique récessive appelée maladie de Krabbe dans laquelle la galactosylcéramidase (GalCase), codée par le gène *GALC*, est déficiente. Les patients atteints par cette pathologie présentent une leucodystrophie avec des cellules globoïdes dont l'origine serait l'accumulation de psychosine ([Jain and De Jesus, 2021](#)). Dans la maladie de Krabbe, la neurodégénérescence observée pourrait être secondaire à une diminution de l'activation de voies de signalisation mitogéniques comme la voie PI3K/AKT/mTOR (*Phosphoinositide 3-kinases/protéine kinase B*). En effet, le traitement par la psychosine de motoneurones empêcherait le recrutement à la membrane de PI3K et mTORC2 localisés en aval du récepteur tyrosine-kinase à l'IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*) ([Sural-Fehr et al., 2019](#)). Le mécanisme proposé serait un enrichissement de psychosine dans le feuillet interne de la membrane plasmique perturbant le déclenchement des voies de signalisation. Les mécanismes moléculaires mis en jeu par la GlcSph dans le contrôle de la prolifération cellulaire ne sont pas connus. Dans les cellules de mélanome, la GlcSph réduit la prolifération cellulaire mais entraîne également de la mort nécrotique. Alors que la nécrose a longtemps été considérée comme une mort cellulaire non contrôlée, ce postulat est reconsidéré depuis quelques années. Une des formes de nécrose décrite est la nécroptose, qui contrairement à l'apoptose, est indépendante des caspases. La nécroptose dépend de l'activation des kinases RIP1 (RIPK1, *receptor interacting protein kinase 1*) et RIP3 (RIPK3) formant le nécrosome qui active leur

substrat MLKL (*mixed lineage kinase domain-like*). Ce dernier, après oligomérisation, transloque à la membrane, modifiant la perméabilité membranaire et entraînant ainsi la mort cellulaire ([Cabon et al., 2013](#)). De manière très intéressante, la mort cellulaire impliquée dans la neurodégénérescence retrouvée chez les patients atteints de la maladie de Gaucher type II n'est pas une mort par apoptose mais par nécroptose ([Vitner et al., 2014](#)). En effet, dans un cerveau humain Gaucher type II ainsi que dans les cortex de souris Gaucher, forme neuronopathique ($Gba^{flox/flox}$; nestin-Cre traitées au CBE), une augmentation de l'expression de RIPK1 et RIPK3 a été retrouvée. De plus, l'inhibition génétique de RIPK3 dans des souris ($Ripk3^{-/-}$) traitées au CBE améliore considérablement les troubles neurologiques de même que la longévité (180 jours contre 40 jours) par rapport aux souris traitées uniquement au CBE. L'implication du GlcCer et de la GlcSph est de plus suspectée dans l'activation de la nécroptose ([Vitner et al., 2014](#); [Yañez et al., 2021](#)). Au vu de ces données, il serait donc pertinent d'analyser plus finement les modalités de mort cellulaire induite par la GlcSph dans les cellules de mélanome. En particulier, en analysant la morphologie des cellules traitées au microscope à transmission électronique ainsi que des événements clés de la nécroptose, comme la phosphorylation de RIPK1, RIPK3 et du substrat MLKL en Western Blot et en vérifiant si l'inhibition de RIPK1 par la nécrostatine-1 ou de RIPK3 par GSK843 ou GSK872 bloque la mort cellulaire induite par la GlcSph.

Comme de nombreux mécanismes cellulaires en cancérologie, la nécroptose peut être associée à des processus anti-tumoraux en empêchant le développement tumoral *via* son effet létal sur les cellules cancéreuses, mais elle peut aussi être associée à des phénomènes pro-tumoraux en générant de l'inflammation et de l'immunosuppression. En effet, la rupture des membranes cellulaires permettrait un relargage de cytokines, de chimiokines, modulant la réponse immune ([Gong et al., 2019](#)). Dans le mélanome, l'expression de RIPK3 est faible mais forte dans les mélanocytes. La nécroptose a surtout été explorée comme une possible piste thérapeutique ([Hartman, 2020](#)). En effet, des molécules permettant d'inhiber le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale activeraient la nécroptose et pourraient ainsi éliminer les cellules de mélanome ([Ashrafizadeh et al., 2019](#)). Néanmoins,

l'inhibition de RIPK1 par le PK68 réduit la survenue de métastases pulmonaires suite à l'injection de cellules de mélanome murin B16-F10 dans les queues de souris C57BL/6 ([Hou et al., 2019](#)). La nécroptose pourrait également générer un environnement immunosuppresseur, comme décrit dans le cancer du pancréas, en promouvant les cellules immunosuppressives (tels que les macrophages associés aux tumeurs ou les MDSC, *myeloid-derived suppressor cells*) ainsi que l'expression de PD-1, qui diminue la réponse immunitaire ([Seifert et al., 2016](#)). Le mécanisme sous-jacent proposé serait que les cellules nécroptotiques libèrent des facteurs solubles qui vont se lier au récepteur Mincle participant à la tumorigenèse. Finalement, la GlcSph, en induisant de la nécroptose, pourrait créer un environnement immunosuppresseur, facilitant la progression tumorale comme observée dans le modèle murin Gaucher et qui ne peut être vue *in vitro*. Il aurait été intéressant d'étudier les populations immunosuppressives dans les mélanomes greffés dans les modèles murins Gaucher utilisés dans notre étude. Cependant, l'analyse de l'infiltrat lymphocytaire des tumeurs, qui a été réalisée par Astudillo et collaborateurs, n'avait pas retrouvé de différences significatives dans la proportion de lymphocytes T, B ou NK par rapport aux souris contrôles (données non montrées ([Astudillo, 2016](#))).

Enfin, la modification de la composition membranaire pourrait être un autre mécanisme par lequel la GlcSph induirait de la mort cellulaire. En effet, des altérations de la composition des membranes des rates et des cortex occipitales de moutons ayant une forme de Gaucher neuronopathique a été observée. Cette altération concerne notamment les radeaux (ou rafts) lipidiques avec une augmentation des taux de GlcCer, de monohexosylsphingosine (GlcSph et/ou GalSph) et des gangliosides et, à l'inverse, une diminution des taux de Chol ([Hein et al., 2017](#)). Les rafts lipidiques constituent des plateformes où sont déclenchées les voies de signalisation en réponse aux stimuli extérieurs. Des voies pro- ou anti-apoptotiques y sont associées ([George and Wu, 2012](#)). Ainsi la modification de la composition des radeaux lipidiques peut altérer la réponse cellulaire. Dans la maladie de Parkinson, l'altération des rafts participe à la neurodégénérescence ([Fabelo et al., 2011](#)). Dans le mélanome, la modification des rafts modifie la réponse au stress comme observée dans des

cellules de mélanome murin (B16F10) traitées par une cyclodextrine (M β CD) entraînant la déplétion des rafts en Chol ([Crul et al., 2020](#)).

D. La glucosylsphingosine génère des cellules de mélanome multinucléées

Nous avons montré que l'administration de GlcSph conduisait à l'apparition de grandes cellules polyploïdes. Cet effet a déjà été décrit sur des cellules endothéliales (HUVEC, *Human umbilical vein endothelial cells*) traitées avec 5 ou 10 μ M de GlcSph à 24h et 48h ([Smith et al., 2018](#)), ainsi que sur des cellules myéloïdes (U937) ([Kanazawa et al., 2000](#)). Cet effet est aussi bien connu pour la psychosine (GalSph). En effet, les cellules globoïdes pathognomoniques de la maladie de Krabbe sont des cellules microgliales géantes multinucléées dont l'origine serait l'accumulation de psychosine ([Kanazawa et al., 2000](#)). Dans le mélanome, des cellules géantes multinucléées ont été décrites ([Boyd et al., 2005](#)) et dans une étude histologique, ces cellules étaient retrouvées dans 6,6% des mélanomes examinés et localisées dans le derme réticulaire. Leur présence ne semblait pas associée à un plus mauvais pronostic ([Srisuttiyakorn et al., 2016](#)). Dans une étude de cas où étaient retrouvées des cellules multinucléées au sein de la tumeur, une surexpression de la cycline D1 a été décrite *in situ* (par FISH) dans ces cellules ([Pouryazdanparast et al., 2009](#)). L'aneuploïdie est généralement délétère pour des cellules normales car elle entraîne une instabilité génomique qui conduit à la mort cellulaire. Dans une cellule cancéreuse, l'aneuploïdie serait mieux tolérée et pourrait leur conférer un avantage sélectif grâce à la diversité génétique acquise. L'aneuploïdie serait donc un avantage pour le développement, la progression, l'invasion tumorale et la résistance aux traitements ([Ben-David and Amon, 2020](#)). Dans notre travail, ces cellules multinucléées apparaissent dès 24h, alors qu'une partie des cellules sont mortes, suggérant que ces cellules montrent une résistance à la mort induit par la GlcSph. Des cellules polyploïdes géantes (ou *polyploid giant cancer cells* (PGCCs)) sont retrouvées dans le cancer du sein en réponse aux traitements et participeraient à la progression tumorale ([Saini et al., 2021](#)).

Divers mécanismes peuvent être à l'origine d'une aneuploïdie ([Lens and Medema, 2019](#)) mais d'après les études sur la psychosine, le mécanisme serait un défaut de cytodierèse ([Kanazawa et al., 2000](#)). Le mécanisme par lequel la psychosine produirait des cellules multinucléées reste encore non élucidé. Le récepteur TDAG-8 (*T-cell death-associated gene 8*), un récepteur couplé aux protéines G, a été évoqué comme possible récepteur à la psychosine ([Im et al., 2001](#)) mais cela a aussi été infirmé ([Radu et al., 2006](#)). Une autre étude a montré que la production des cellules globoïdes serait secondaire à une augmentation de l'expression de la MMP-3 (*matrix metalloproteinase-3*) dépendante de la psychosine ([Ijichi et al., 2013](#)). Une autre hypothèse serait que l'accumulation de psychosine modifie la composition membranaire avec une altération du ratio GSLs/SM. En effet, des cellules lymphoïdes (lignée Namalwa) traitées par la psychosine présentent une diminution du regroupement de molécules de SM et la suppression de la production du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate nécessaire à la constitution du sillon de division ([Watanabe et al., 2016](#)). A notre connaissance, il n'existe aujourd'hui aucune étude publiée sur les mécanismes moléculaires par lesquels la GlcSph générerait les cellules multinucléées.

Il aurait été intéressant d'étudier le rôle des cellules multinucléées produites sous l'effet de la GlcSph dans la progression des mélanomes notamment en analysant leur réponse aux traitements et leurs capacités migratoires. Pour cela, il faudrait pouvoir isoler un grand nombre de cellules multinucléées, or seulement 7% des cellules sont devenues multinucléées dans les conditions utilisées dans notre étude.

E. La glucosylsphingosine sensibilise les cellules de mélanome en condition de stress

Les capacités de survie des cellules de mélanome ont été étudiées en réponse à la privation de sérum, qui génère un stress oxydant ainsi qu'au dabrafénib, qui inhibe la voie MAPK. La GlcSph a sensibilisé les cellules de mélanome à la privation de sérum mais également au dabrafénib. La GlcSph favoriserait donc la mort cellulaire en conditions de stress. Le rôle de la GlcSph dans la réponse aux traitements n'a jamais été rapporté alors que celui du GlcCer a déjà été associé à la résistance aux chimiothérapies ([Wegner et al., 2018](#)). Les cellules traitées au CBE présentent un taux de GlcSph élevé et un taux de GlcCer inchangé, suggérant une probable transformation du GlcCer en GlcSph par la ACDase. Pour vérifier cette hypothèse, les cellules ont été traitées conjointement par le CBE et le carmofur, un inhibiteur de la ACDase. Les résultats ont montré que l'effet sensibilisant du CBE vis-à-vis du dabrafénib est supprimé par le co-traitement avec le carmofur. Toutefois, ces résultats sont très préliminaires et doivent être confirmés et complétés par le dosage de l'activité de la ACDase ainsi que par le dosage du GlcCer et de la GlcSph dans ces différentes conditions. De plus, il conviendrait d'étudier la réponse aux thérapies ciblées des cellules traitées avec le GlcCer, bien que le mécanisme de résistance lié au GlcCer (expression d'une protéine d'efflux) soit différent des mécanismes de résistance aux thérapies ciblées (réactivation de voies de signalisation de prolifération ou de survie). De plus, il faudrait tester d'autres doses de dabrafénib ainsi que d'autres thérapies ciblées comme le tramétinib qui cible la protéine kinase MEK.

F. Les effets induits par la glucosylsphingosine sont dépendants de sa concentration cellulaire

L'ensemble de nos résultats indiquent que les effets cellulaires précédemment décrits n'ont été observés que dans les cellules traitées par la GlcSph exogène et non dans les cellules où la GCCase a été inhibée. L'analyse des SL des différents modèles cellulaires utilisés pourrait nous aider à préciser les mécanismes sous-jacents. Une nette différence est mesurée entre les taux cellulaires de GlcSph dans les cellules traitées par la GlcSph (à 2,5 μ M : 1,6 nmol/mg de protéine; à 5 μ M : 4,1 nmol/ mg de protéine) et les cellules dans lesquelles la GCCase a été inhibée (sh1 : 0,73 pmol/mg de protéine; sh2 : 0,48 pmol/mg de protéine; CBE : 4.57 pmol/mg de protéine). De plus, une augmentation significative du taux cellulaire de So par rapport aux cellules non traitées a été retrouvée uniquement dans les cellules traitées par la GlcSph, indiquant un probable catabolisme de la GlcSph en So. Une légère augmentation non significative ($p=0.0507$) de la concentration en S1P a aussi été notée dans les cellules traitées avec la GlcSph à 5 μ M. Aucune autre modification significative n'a été observée dans ces modèles cellulaires. Les taux de GlcSph et de So sont augmentés dans le plasma et dans les globules rouges de patients Gaucher ([Chipeaux et al., 2017](#)). Comme décrit précédemment, la GlcSph pourrait agir en promouvant la nécrose cellulaire ou en modifiant la composition lipidique des membranes. Quant à l'effet de la So, aucune étude n'a été réalisée sur le mélanome mais dans d'autres cancers ; elle pourrait induire de la mort apoptotique ([Cu villier, 2002](#)). De manière intéressante, dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF), l'inhibition du métabolisme oxydatif provoque une élévation des taux de So et de S1P associée à de la nécroptose, et sous la dépendance de la céramidase neutre ([Sundaram et al., 2016](#)).

G. La glucosylsphingosine ne serait pas métabolisée par la glucosylcéramidase lysosomale

L'effet transitoire de la GlcSph exogène sur la prolifération des cellules de mélanome ainsi que la production de So suggère un catabolisme de la GlcSph. La GCase semblait être une bonne candidate pour métaboliser la GlcSph en glucose et So, cependant son inhibition (par le CBE) n'a pas permis de prolonger l'effet de la GlcSph, indiquant que l'effet de la GlcSph sur la croissance serait indépendant de la GCase lysosomale. Cela a également été observé dans un modèle cellulaire de maladie de Krabbe où la psychosine exerçait les mêmes effets, que ces fibroblastes aient ou non un déficit de l'activité enzymatique de la GALC ([Dickerman et al., 1981](#)). La GCase 2 présente au niveau du RE pourrait participer au catabolisme de la GlcSph. Pour aller plus loin, il aurait été nécessaire d'étudier la croissance, le cycle cellulaire ainsi que la composition en SL de cellules traitées par la GlcSph mais dans lesquelles la GCase2 a été inhibée.

II. Glucosylcéramidase, glucosylsphingosine, mélanome et alpha-synucléine

Nous avons vu dans la partie introductive que l'alpha-synucléine, exprimée dans les mélanocytes et les cellules de mélanome ([Matsuo and Kamitani, 2010](#)), pourrait altérer la synthèse de mélanine ([Pan et al., 2012](#)) et favoriser la croissance tumorale ([Israeli et al., 2011](#)). Au plan physiologique, l'alpha-synucléine est une protéine monomérique de 18kDa qui aurait une conformation hélicoïdale, impliquée essentiellement dans la neurotransmission dopaminergique ([Burre et al., 2018](#)). Cependant, le mauvais repliement de l'alpha-synucléine, secondaire à une augmentation de sa concentration ou à une mutation, est responsable de son agrégation ([Burre et al., 2018](#)). Ce phénomène contribue très vraisemblablement à la pathogénie de la maladie de Parkinson. On sait aujourd'hui que les mutations (hétérozygotes ou homozygotes) du gène *GBA* représentent le premier facteur de risque de développer la maladie de Parkinson ([Benitez et al., 2016](#); [Sidransky et al., 2009](#)). De plus, la dégradation de l'alpha-synucléine dépendrait de la voie lysosomale, par macroautophagie ([Stefanis et al., 2019](#)). Enfin, de nombreuses observations décrivent un lien entre le déficit de la GCCase et la modification de l'expression de l'alpha-synucléine (cf. Partie I.C.3.b).

Alors que dans la première partie expérimentale, notre objectif était d'étudier le rôle de la GlcSph qui s'accumule lors du déficit de la GCCase dans le mélanome, dans cette seconde partie, nous avons testé si l'expression de l'alpha-synucléine est régulée par la GCCase ou la GlcSph dans le mélanome. Nous avons observé que l'expression d'alpha-synucléine dans des cellules de mélanome A375 dans lesquelles la GCCase a été inhibée par shARN ou par le CBE n'est pas modifiée par rapport aux cellules contrôles (données non montrées). Or, d'après la littérature, le meilleur modèle *in vitro* pour étudier l'expression de l'alpha-synucléine serait des cellules dans lesquelles la protéine sauvage ou mutée est surexprimée ([Delenclos et al., 2019](#)). Le mutant p.A53T de l'alpha-synucléine est retrouvé dans une forme familiale de maladie de Parkinson et augmenterait les capacités d'agrégation de la protéine

([Puschmann, 2013](#)). La surexpression de la forme sauvage représente également un modèle cellulaire de Parkinson, car les amplifications géniques sont fréquemment retrouvées dans cette pathologie ([Delenclos et al., 2019](#)). Dans les cellules de mélanome A375 surexprimant l'alpha-synucléine sauvage ou le mutant p.A53T, nos résultats montrent que le traitement par le CBE n'a pas modifié l'expression de la protéine par rapport aux cellules non traitées. Par contre, le traitement par la GlcSph semblerait augmenter l'expression de l'alpha-synucléine, aussi bien dans les cellules surexprimant la forme sauvage que dans celles exprimant la forme mutée, un effet déjà décrit dans des neurones de souris Gaucher ([Taguchi et al., 2017](#)). Il faut noter tout de même que l'expression de la forme sauvage était, avant traitement, plus forte que celle de la forme mutée. Cela n'a pas été retrouvé dans des neurones primaires mais l'anticorps utilisé était différent des nôtres ([Koch et al., 2015](#)). L'ensemble de ces résultats suggère que l'expression de l'alpha-synucléine pourrait être dépendante des concentrations cellulaires de GlcSph, qui comme nous l'avons vu précédemment, sont différentes selon que les cellules sont traitées par le CBE ou la GlcSph. Cela pourrait expliquer aussi les discordances observées dans la littérature. En effet, comme exposé dans l'introduction, certains travaux sont en faveur d'un rôle de la GCase dans la formation d'agrégats d'alpha-synucléine, alors que d'autres l'infirmement (cf. Partie I.C.3.b).

Dans notre étude, seule la forme monomérique de 18kDa a été retrouvée, bien que nous ayons cherché à visualiser, sans succès, les formes oligomériques (> 60kDa) qui sont des formes intermédiaires entre la conformation physiologique et pathologique. En particulier, nous avons utilisé 2 anticorps monoclonaux anti-alpha-synucléine dont le clone syn211 qui avait été rapporté pour détecter les formes oligomériques. Cependant, sa spécificité peut être discutée car celui-ci n'a été testé que sur de l'alpha-synucléine purifiée sous diverses formes : monomérique, oligomérique ou fibrillaire ([Kumar et al., 2020](#)). De plus, nous pouvons aussi nous interroger sur le degré de surexpression du mutant p.A53T qui pourrait avoir été insuffisant pour pouvoir détecter des formes oligomériques de l'alpha-synucléine dans les cellules de mélanome.

Il semblerait donc que l'étude de l'expression de l'alpha-synucléine par Western Blot ne soit pas la méthode la plus optimale. Bien que la surexpression de la forme monomérique indiquerait une possible capacité de l'alpha-synucléine à s'agréger, des analyses supplémentaires doivent être réalisées afin de valider la présence d'agrégats. Des tests simples peu spécifiques peuvent démontrer la présence d'agrégats de protéines amyloïdes, comme la présence d'inclusions cytoplasmiques, le marquage à la thioflavine S ou la résistance à la digestion par la protéinase K. Il existe d'autres techniques plus spécifiques pour doser/détecter les agrégats d'alpha-synucléine comme l'ELISA, le dichroïsme circulaire ou l'ajout de fibrilles pré-formées d'alpha-synucléine (PFF, *preformed fibrils*) sur des cellules en culture. L'ajout de PFF aux cellules permettrait de tester les capacités d'agrégation de l'alpha-synucléine endogène ([Volpicelli-Daley et al., 2014](#)).

Dans le chapitre introductif, nous avons mentionné que l'expression de l'alpha-synucléine pourrait être associée à l'expression de la GCCase mutée et non à son niveau d'activité catalytique. Pour tester cette hypothèse, nous avons généré des cellules de mélanome humain A375 dans lesquelles la GCCase sauvage ainsi que 3 mutants (p.N409S, p.E365K et p.T408M) ont été surexprimés par une transduction lentivirale (Figure 59). Ces 3 mutants avaient été retrouvés dans l'analyse de l'exome de patients atteints de mélanome (cf. Partie II.E) et ces 3 mutants de *GBA* sont également associés à la maladie de Parkinson ([Benitez et al., 2016](#)). La Figure 59 montre que l'expression (Figure 59A) et l'activité enzymatique (Figure 59B) de la GCCase sont significativement augmentées dans les cellules surexprimant la protéine sauvage (WT) par rapport aux cellules non transduites (nt) ou transduites avec le lentivecteur pTRIP vide (EV). Dans les cellules contenant une GCCase mutée, la protéine est bien surexprimée. L'activité enzymatique de la GCCase y est plus faible que dans les cellules surexprimant la forme sauvage mais plus forte que dans les cellules contenant le lentivecteur vide. A partir de ces différents modèles de cellules de mélanome, il sera donc intéressant de surexprimer l'alpha-synucléine sauvage ou mutée afin d'étudier comment les différents mutants de GCCase affectent l'expression de cette protéine.

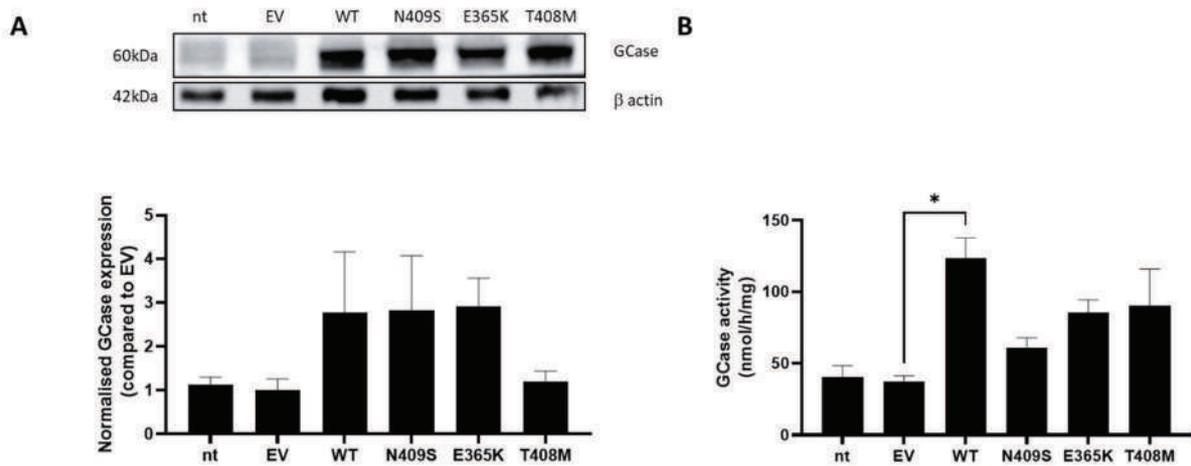


Figure 59. Génération de cellules de mélanome humain A375 surexprimant la forme sauvage ou mutée de la GCCase.

Pour obtenir ces différents modèles cellulaires, de l'ADNc du gène *GBA* a été amplifié à partir de fibroblastes humains issus de sujets sains, puis un clonage a été réalisé dans le plasmide pcDNA3. Les mutations p.N409S, p.E365K et p.T408M ont été introduites par mutagenèse dirigée (kit Stratagene®) dans ce plasmide. Les séquences sauvage et mutées ont été ensuite extraites par digestion enzymatique (XbaI et BsiWI) et clonées dans un plasmide navette pTRIP-CMV-LucR-P2A-eGFP ou mCherry contenant une séquence P2A. Ces plasmides navettes ont été ensuite transmis à la plateforme de vectorologie du CRCT, pour production de lentivecteurs. Ces derniers codant pour la GCCase sauvage ou mutée (600 μ L) ont été ajoutés à 30 000 cellules de mélanome A375 en présence de sulfate de protamine (5 μ g/ml). Après 6h d'incubation à 37°C, le milieu a été éliminé et, les cellules ont été rincées avec du tampon phosphate salin (PBS) et du milieu DMEM 10% SVF a été ajouté. Ici, les cellules A375 ont été transduites ou non (nt) par le vecteur pTRIP vide (EV) ou codant pour la GCCase sauvage (WT) ou mutée (mutations ponctuelles indiquées). **A.** Expression de la GCCase par Western Blot avec sa quantification (moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes). **B.** Activité enzymatique de la GCCase testée avec un substrat fluorogénique (moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes). Les comparaisons des données ont été faites en utilisant les tests de Kruskal-Wallis. L'astérisque indique une différence statistiquement significative : *, $p < 0.05$.

Conclusion

Nos travaux ont montré que la GlcSph pourrait jouer un rôle dans la progression du mélanome, en promouvant la nécrose, la génération de cellules polyploïdes, en modifiant la sensibilité des cellules à certaines conditions de stress et en modulant peut-être l'expression de l'alpha-synucléine. Néanmoins, le mécanisme d'action ainsi que le métabolisme de la GlcSph restent à ce jour mal connus. D'après nos résultats, ces effets pourraient être liés à l'augmentation de sa concentration cellulaire ou à la production de So. Cependant, de nombreuses interrogations restent en suspens, comme le mode de transport de la GlcSph (tant la forme physico-chimique de la GlcSph présente dans le milieu extracellulaire que ses mouvements et son mode de transport à l'intérieur des cellules) ainsi que ses cibles intracellulaires et/ou membranaires. N'ayant pas fait la preuve de la présence de GlcSph dans le milieu extracellulaire des cellules dans lesquelles la GCCase a été inhibée, les effets obtenus sur les cellules traitées par la GlcSph pourraient être liés uniquement à la voie d'abord exogène et donc à une possible interaction récepteur-ligand ou une modification de la composition des rafts lipidiques, modulant ainsi des voies de signalisation.

Bien que nos modèles cellulaires présentent des limites, le traitement par la GlcSph de ces différents modèles (cellules parentales et cellules dont la GCCase a été inhibée) pourrait, malgré tout, mimer des conditions proches de la maladie de Gaucher, où une cellule de mélanome pourrait être plus ou moins exposée à une source locale et importante de GlcSph (macrophages ou environnement enrichi en GlcSph *via* la GlcCer déacylase). Ainsi, nos résultats, obtenus *in vitro* et sur un seul type cellulaire (cellules de mélanome) demandent à être confirmés sur d'autres lignées cellulaires de mélanome et sur des modèles d'étude plus complexes comme la co-culture (cellules de mélanome et macrophages ou kératinocytes déficitaires en GCCase) voire sur un modèle de peaux reconstruites. Notre équipe utilise actuellement cette dernière technologie pour étudier l'impact de la S1P, un oncométabolite, sur l'invasion des cellules de mélanome dans le derme en modulant l'enzyme qui la produit (SK1) dans les

kératinocytes. Ainsi la modulation de la GCCase dans les kératinocytes dans des peaux reconstruites pourrait permettre de valider (ou non) nos observations sur la progression tumorale.

En contrôlant les concentrations de GlcCer et de GlcSph, la GCCase (relayée par l'ACDase ou une déacylase épidermique) pourrait donc jouer un rôle dans le mélanome cutané. Alors que le lien entre la maladie de Gaucher et la survenue de pathologies malignes est relativement bien documenté, mais encore énigmatique au plan mécanistique, l'impact des traitements de la maladie de Gaucher (enzymothérapie et réduction de substrat) reste malheureusement inconnu.

Enfin, la GlcSph pourrait-elle être considérée comme un oncométabolite, c'est-à-dire participant à la tumorigenèse ? L'analyse des mutants de *GBA* retrouvés dans l'exome des tumeurs pourrait être contributive notamment en générant ces mutants dans les mélanocytes ou en traitant les mélanocytes avec la GlcSph.

La GlcSph nous laisse donc encore de nombreux mystères à résoudre. Quant à l'analogie avec l'écologie, si la réduction des déchets produits (ici, le GlcCer) semble fondamentale pour préserver la planète, il semble tout aussi vital de prendre correctement en charge ces déchets afin d'éviter leur transformation en des molécules (comme la GlcSph) dont le potentiel toxique demeure inconnu et non maîtrisable. Une meilleure compréhension des mécanismes d'action et de genèse de ce lysolipide permettrait de préciser son rôle en oncologie et d'envisager peut-être des stratégies thérapeutiques additionnelles (telles que l'inhibition de l'ACDase, qui réduirait la production de GlcSph et favoriserait l'accumulation du Cer, anti-oncométabolite).

Références bibliographiques

- Aflaki, E., Stubblefield, B.K., Maniwang, E., Lopez, G., Moaven, N., Goldin, E., Marugan, J., Patnaik, S., Dutra, A., Southall, N., *et al.* (2014). Macrophage models of Gaucher disease for evaluating disease pathogenesis and candidate drugs. *Sci Transl Med* 6, 240ra273.
- Akiyama, H., and Hirabayashi, Y. (2017). A novel function for glucocerebrosidase as a regulator of sterylglucoside metabolism. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1861, 2507-2514.
- Akiyama, H., Kobayashi, S., Hirabayashi, Y., and Murakami-Murofushi, K. (2013). Cholesterol glucosylation is catalyzed by transglucosylation reaction of β -glucosidase 1. *Biochem Biophys Res Commun* 441, 838-843.
- Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Aparicio, S.A., Behjati, S., Biankin, A.V., Bignell, G.R., Bolli, N., Borg, A., Børresen-Dale, A.L., *et al.* (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500, 415-421.
- Allen, M.J., Myer, B.J., Khokher, A.M., Rushton, N., and Cox, T.M. (1997). Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: increased release of interleukin-6 and interleukin-10. *QJM* 90, 19-25.
- Anderson, R.R., and Parrish, J.A. (1981). The optics of human skin. *J Invest Dermatol* 77, 13-19.
- Angka, L., Lee, E.A., Rota, S.G., Hanlon, T., Sukhai, M., Minden, M., McMillan, E.M., Quadrilatero, J., and Spagnuolo, P.A. (2014). Glucopsychosine increases cytosolic calcium to induce calpain-mediated apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Cancer Lett* 348, 29-37.
- Arends, M., van Dussen, L., Biegstraaten, M., and Hollak, C.E.M. (2013). Malignancies and monoclonal gammopathy in Gaucher disease; a systematic review of the literature. *Br J Haematol* 161, 832-842.
- Ashrafizadeh, M., Mohammadinejad, R., Tavakol, S., Ahmadi, Z., Roomiani, S., and Katebi, M. (2019). Autophagy, anoikis, ferroptosis, necroptosis, and endoplasmic reticulum stress: Potential applications in melanoma therapy. *J Cell Physiol* 234, 19471-19479.
- Astudillo, L. (2016). Rôle des sphingolipides dans la cancérogenèse: l'exemple de la maladie de Gaucher (Toulouse, France: Université Toulouse III - Paul Sabatier).
- Astudillo, L., Therville, N., Colacios, C., Ségui, B., Andrieu-Abadie, N., and Levade, T. (2016). Glucosylceramidases and malignancies in mammals. *Biochimie* 125, 267-280.
- Atsumi, S., Nosaka, C., Iinuma, H., and Umezawa, K. (1993). Accumulation of tissue glucosylsphingosine in Gaucher-like mouse induced by the glucosylceramidase inhibitor cyclophellitol. *Arch Biochem Biophys* 304, 302-304.
- Awad, O., Sarkar, C., Panicker, L.M., Miller, D., Zeng, X., Sgambato, J.A., Lipinski, M.M., and Feldman, R.A. (2015). Altered TFEB-mediated lysosomal biogenesis in Gaucher disease iPSC-derived neuronal cells. *Hum Mol Genet* 24, 5775-5788.
- Bae, E.J., Yang, N.Y., Song, M., Lee, C.S., Lee, J.S., Jung, B.C., Lee, H.J., Kim, S., Masliah, E., Sardi, S.P., *et al.* (2014). Glucocerebrosidase depletion enhances cell-to-cell transmission of α -synuclein. *Nat Commun* 5, 4755.
- Bakir, B., Chiarella, A.M., Pitarresi, J.R., and Rustgi, A.K. (2020). EMT, MET, Plasticity, and Tumor Metastasis. *Trends Cell Biol* 30, 764-776.

- Balkwill, F. (2006). TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 25, 409-416.
- Ballabio, A., and Bonifacino, J.S. (2020). Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 101-118.
- Barkhuizen, M., Anderson, D.G., and Grobler, A.F. (2016). Advances in GBA-associated Parkinson's disease – Pathology, presentation and therapies. *Neurochem Int* 93, 6-25.
- Batta, G., Soltész, L., Kovács, T., Bozó, T., Mészár, Z., Kellermayer, M., Szöllősi, J., and Nagy, P. (2018). Alterations in the properties of the cell membrane due to glycosphingolipid accumulation in a model of Gaucher disease. *Sci Rep* 8, 157.
- Ben-David, U., and Amon, A. (2020). Context is everything: aneuploidy in cancer. *Nat Rev Genet* 21, 44-62.
- Bendikov-Bar, I., Rapaport, D., Larisch, S., and Horowitz, M. (2014). Parkin-mediated ubiquitination of mutant glucocerebrosidase leads to competition with its substrates PARIS and ARTS. *Orphanet J Rare Dis* 9, 86.
- Benitez, B.A., Davis, A.A., Jin, S.C., Ibanez, L., Ortega-Cubero, S., Pastor, P., Choi, J., Cooper, B., Perlmutter, J.S., and Cruchaga, C. (2016). Resequencing analysis of five Mendelian genes and the top genes from genome-wide association studies in Parkinson's Disease. *Mol Neurodegener* 11, 29.
- Benjamin, D., Joshua, H., Djaldetti, M., Hazaz, B., and Pinkhas, J. (1979). Nonsecretory IgD-kappa multiple myeloma in a patient with Gaucher's disease. *Scand J Haematol* 22, 179-184.
- Berg-Fussman, A., Grace, M.E., Ioannou, Y., and Grabowski, G.A. (1993). Human acid beta-glucosidase. N-glycosylation site occupancy and the effect of glycosylation on enzymatic activity. *J Biol Chem* 268, 14861-14866.
- Berkovic, S.F., Dibbens, L.M., Oshlack, A., Silver, J.D., Katerelos, M., Vears, D.F., Lüllmann-Rauch, R., Blanz, J., Zhang, K.W., Stankovich, J., *et al.* (2008). Array-based gene discovery with three unrelated subjects shows SCARB2/LIMP-2 deficiency causes myoclonus epilepsy and glomerulosclerosis. *Am J Hum Genet* 82, 673-684.
- Berson, J.F., Harper, D.C., Tenza, D., Raposo, G., and Marks, M.S. (2001). Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. *Mol Biol Cell* 12, 3451-3464.
- Bertolotto, C., Abbe, P., Hemesath, T.J., Bille, K., Fisher, D.E., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (1998a). Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J Cell Biol* 142, 827-835.
- Bertolotto, C., Buscà, R., Abbe, P., Bille, K., Aberdam, E., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (1998b). Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia. *Mol Cell Biol* 18, 694-702.
- Bertolotto, C., Lesueur, F., Giuliano, S., Strub, T., de Lichy, M., Bille, K., Dessen, P., d'Hayer, B., Mohamdi, H., Remenieras, A., *et al.* (2011). A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature* 480, 94-98.
- Bertoni, J.M., Arlette, J.P., Fernandez, H.H., Fitzner-Attas, C., Frei, K., Hassan, M.N., Isaacson, S.H., Lew, M.F., Molho, E., Ondo, W.G., *et al.* (2010). Increased melanoma risk in Parkinson disease: a prospective clinicopathological study. *Arch Neurol* 67, 347-352.
- Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.

- Bonaventure, J., Domingues, M.J., and Larue, L. (2013). Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of melanocytes and melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 26, 316-325.
- Boniol, M., Autier, P., Boyle, P., and Gandini, S. (2012). Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. *Bmj* 345, e4757.
- Boot, R.G., Verhoek, M., de Fost, M., Hollak, C.E., Maas, M., Bleijlevens, B., van Breemen, M.J., van Meurs, M., Boven, L.A., Laman, J.D., *et al.* (2004). Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention. *Blood* 103, 33-39.
- Boot, R.G., Verhoek, M., Donker-Koopman, W., Strijland, A., van Marle, J., Overkleeft, H.S., Wennekes, T., and Aerts, J.M. (2007). Identification of the non-lysosomal glucosylceramidase as beta-glucosidase 2. *J Biol Chem* 282, 1305-1312.
- Bose, A., Petsko, G.A., and Eliezer, D. (2018). Parkinson's Disease and Melanoma: Co-Occurrence and Mechanisms. *J Parkinsons Dis* 8, 385-398.
- Boutin, M., Gagnon, R., Lavoie, P., and Auray-Blais, C. (2012). LC-MS/MS analysis of plasma lyso-Gb3 in Fabry disease. *Clin Chim Acta* 414, 273-280.
- Boven, L.A., van Meurs, M., Boot, R.G., Mehta, A., Boon, L., Aerts, J.M., and Laman, J.D. (2004). Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. *Am J Clin Pathol* 122, 359-369.
- Boyd, A.S., Wu, H., and Shyr, Y. (2005). Monster cells in malignant melanoma. *Am J Dermatopathol* 27, 208-210.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Braunstein, H., Maor, G., Chicco, G., Filocamo, M., Zimran, A., and Horowitz, M. (2018). UPR activation and CHOP mediated induction of GBA1 transcription in Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 68, 21-29.
- Breiden, B., and Sandhoff, K. (2019). Lysosomal Glycosphingolipid Storage Diseases. *Annu Rev Biochem* 88, 461-485.
- Breiden, B., and Sandhoff, K. (2020). Mechanism of Secondary Ganglioside and Lipid Accumulation in Lysosomal Disease. *Int J Mol Sci* 21.
- Brown, R.A., Voit, A., Srikanth, M.P., Thayer, J.A., Kingsbury, T.J., Jacobson, M.A., Lipinski, M.M., Feldman, R.A., and Awad, O. (2019). mTOR hyperactivity mediates lysosomal dysfunction in Gaucher's disease iPSC-neuronal cells. *Dis Model Mech* 12.
- Bruckstein, A.H., Karanas, A., and Dire, J.J. (1980). Gaucher's disease associated with Hodgkin's disease. *Am J Med* 68, 610-613.
- Burre, J., Sharma, M., and Sudhof, T.C. (2018). Cell Biology and Pathophysiology of alpha-Synuclein. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8.
- Burrow, T.A., Sun, Y., Prada, C.E., Bailey, L., Zhang, W., Brewer, A., Wu, S.W., Setchell, K.D.R., Witte, D., Cohen, M.B., *et al.* (2015). CNS, lung, and lymph node involvement in Gaucher disease type 3 after 11 years of therapy: clinical, histopathologic, and biochemical findings. *Mol Genet Metab* 114, 233-241.
- Burstein, Y., Rechavi, G., Rausen, A.R., Frisch, B., and Spierer, Z. (1985). Association of Gaucher's disease and lymphoid malignancy in 2 children. *Scand J Haematol* 35, 445-447.

- Butler, B., Sambo, D., and Khoshbouei, H. (2017). Alpha-synuclein modulates dopamine neurotransmission. *J Chem Neuroanat* 83-84, 41-49.
- Cabon, L., Martinez-Torres, A.C., and Susin, S.A. (2013). [Programmed cell death comes in many flavors]. *Med Sci (Paris)* 29, 1117-1124.
- Cancer Genome Atlas Network (2015). Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* 161, 1681-1696.
- Caramel, J., Papadogeorgakis, E., Hill, L., Browne, G.J., Richard, G., Wierinckx, A., Saldanha, G., Osborne, J., Hutchinson, P., Tse, G., *et al.* (2013). A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell* 24, 466-480.
- Carrié, L., Virazels, M., Dufau, C., Montfort, A., Levade, T., Ségui, B., and Andrieu-Abadie, N. (2020). New Insights into the Role of Sphingolipid Metabolism in Melanoma. *Cells* 9.
- Carubbi, F., Cappellini, M.D., Fargion, S., Fracanzani, A.L., and Nascimbeni, F. (2020). Liver involvement in Gaucher disease: A practical review for the hepatologist and the gastroenterologist. *Dig Liver Dis* 52, 368-373.
- Chahine, L.M., Qiang, J., Ashbridge, E., Minger, J., Yearout, D., Horn, S., Colcher, A., Hurtig, H.I., Lee, V.M., Van Deerlin, V.M., *et al.* (2013). Clinical and biochemical differences in patients having Parkinson disease with vs without GBA mutations. *JAMA Neurol* 70, 852-858.
- Chang-Lo, M., Yam, L.T., Rubenstone, A.I., and Schwartz, S.O. (1975). Gaucher's disease associated with chronic lymphocytic leukaemia, gout and carcinoma. *J Pathol* 116, 203-207.
- Chipeaux, C., de Person, M., Burguet, N., Billette de Villemeur, T., Rose, C., Belmatoug, N., Héron, S., Le Van Kim, C., Franco, M., and Moussa, F. (2017). Optimization of ultra-high pressure liquid chromatography - tandem mass spectrometry determination in plasma and red blood cells of four sphingolipids and their evaluation as biomarker candidates of Gaucher's disease. *J Chromatogr A* 1525, 116-125.
- Corbett, G.M., Darbyshire, P.J., Besley, G.T., and Parker, A.C. (1987). Adult Gaucher disease in association with acute leukaemia. *Postgrad Med J* 63, 899-900.
- Cox, T.M., Drelichman, G., Cravo, R., Balwani, M., Burrow, T.A., Martins, A.M., Lukina, E., Rosenbloom, B., Ross, L., Angell, J., *et al.* (2015). 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* 385, 2355-2362.
- Crul, T., Csoboz, B., Gombos, I., Marton, A., Peter, M., Balogh, G., Vizler, C., Sente, L., and Vigh, L. (2020). Modulation of Plasma Membrane Composition and Microdomain Organization Impairs Heat Shock Protein Expression in B16-F10 Mouse Melanoma Cells. *Cells* 9.
- Cubillos-Ruiz, J.R., Bettigole, S.E., and Glimcher, L.H. (2017). Tumorigenic and Immunosuppressive Effects of Endoplasmic Reticulum Stress in Cancer. *Cell* 168, 692-706.
- Cui, R., Widlund, H.R., Feige, E., Lin, J.Y., Wilensky, D.L., Igras, V.E., D'Orazio, J., Fung, C.Y., Schanbacher, C.F., Granter, S.R., *et al.* (2007). Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* 128, 853-864.
- Cullen, V., Sardi, S.P., Ng, J., Xu, Y.H., Sun, Y., Tomlinson, J.J., Kolodziej, P., Kahn, I., Saftig, P., Woulfe, J., *et al.* (2011). Acid β -glucosidase mutants linked to Gaucher disease, Parkinson disease, and Lewy body dementia alter α -synuclein processing. *Ann Neurol* 69, 940-953.
- Cuvillier, O. (2002). Sphingosine in apoptosis signaling. *Biochim Biophys Acta* 1585, 153-162.

- D'Mello, S.A., Finlay, G.J., Baguley, B.C., and Askarian-Amiri, M.E. (2016). Signaling Pathways in Melanogenesis. *Int J Mol Sci* 17.
- Dalbies, F., Ianotto, J.C., Marion, V., and Berthou, C. (2009). Le suivi de la maladie de Gaucher: une approche pluridisciplinaire. *Hématologie* 15, 281-290.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., *et al.* (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949-954.
- de Fost, M., Out, T.A., de Wilde, F.A., Tjin, E.P.M., Pals, S.T., van Oers, M.H.J., Boot, R.G., Aerts, J.F.M.G., Maas, M., Vom Dahl, S., *et al.* (2008). 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, 439-449.
- de Fost, M., Vom Dahl, S., Weverling, G.J., Brill, N., Brett, S., Häussinger, D., and Hollak, C.E.M. (2006). Increased incidence of cancer in adult Gaucher disease in Western Europe. *Blood Cells Mol Dis* 36, 53-58.
- Dean, D.N., and Lee, J.C. (2020). Defining an amyloid link Between Parkinson's disease and melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 22671-22673.
- Decressac, M., Mattsson, B., Weikop, P., Lundblad, M., Jakobsson, J., and Bjorklund, A. (2013). TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from α -synuclein toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, E1817-E1826.
- Deegan, P.B., Moran, M.T., McFarlane, I., Schofield, J.P., Boot, R.G., Aerts, J.M., and Cox, T.M. (2005). Clinical evaluation of chemokine and enzymatic biomarkers of Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 35, 259-267.
- Dekker, N., van Dussen, L., Hollak, C.E., Overkleeft, H., Scheij, S., Ghauharali, K., van Breemen, M.J., Ferraz, M.J., Groener, J.E., Maas, M., *et al.* (2011a). Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response. *Blood* 118, e118-127.
- Dekker, N., Voorn-Brouwer, T., Verhoek, M., Wennekes, T., Narayan, R.S., Speijer, D., Hollak, C.E., Overkleeft, H.S., Boot, R.G., and Aerts, J.M. (2011b). The cytosolic β -glucosidase GBA3 does not influence type 1 Gaucher disease manifestation. *Blood Cells Mol Dis* 46, 19-26.
- Delenclos, M., Burgess, J.D., Lamprokostopoulou, A., Outeiro, T.F., Vekrellis, K., and McLean, P.J. (2019). Cellular models of alpha-synuclein toxicity and aggregation. *J Neurochem* 150, 566-576.
- Dell'Angelica, E.C., Mullins, C., Caplan, S., and Bonifacino, J.S. (2000). Lysosome-related organelles. *Faseb j* 14, 1265-1278.
- Deng, W., Li, R., Guerrero, M., Liu, Y., and Ladisch, S. (2002). Transfection of glucosylceramide synthase antisense inhibits mouse melanoma formation. *Glycobiology* 12, 145-152.
- Dermentzaki, G., Dimitriou, E., Xilouri, M., Michelakakis, H., and Stefanis, L. (2013). Loss of β -glucocerebrosidase activity does not affect alpha-synuclein levels or lysosomal function in neuronal cells. *PLoS ONE* 8, e60674.
- Dettmer, U., Newman, A.J., Soldner, F., Luth, E.S., Kim, N.C., von Saucken, V.E., Sanderson, J.B., Jaenisch, R., Bartels, T., and Selkoe, D. (2015). Parkinson-causing α -synuclein missense mutations shift native tetramers to monomers as a mechanism for disease initiation. *Nat Commun* 6, 7314.
- Dibbens, L., Schwake, M., Saftig, P., and Rubboli, G. (2016). SCARB2/LIMP2 deficiency in action myoclonus-renal failure syndrome. *Epileptic Disord* 18, 63-72.

Dickerman, L.H., Kurczynski, T.W., and Macbride, R.G. (1981). The effects of psychosine upon growth of human skin fibroblasts from patients with globoid cell leukodystrophy. *J Neurol Sci* 50, 181-190.

Du, J., Miller, A.J., Widlund, H.R., Horstmann, M.A., Ramaswamy, S., and Fisher, D.E. (2003). MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am J Pathol* 163, 333-343.

Dubot, P., Astudillo, L., Therville, N., Sabourdy, F., Stirnemann, J., Levade, T., and Andrieu-Abadie, N. (2020). Are Glucosylceramide-Related Sphingolipids Involved in the Increased Risk for Cancer in Gaucher Disease Patients? Review and Hypotheses. *Cancers (Basel)* 12.

Dubot, P., Rafiq, M., Curot, J., Simonetta-Moreau, M., Sabourdy, F., Pettazzoni, M., Froissart, R., Levade, T., and Ory-Magne, F. (2021). A diagnosis of progressive myoclonic ataxia guided by blood biomarkers. *Parkinsonism Relat Disord*.

Duran, R., Mencacci, N.E., Angeli, A.V., Shoai, M., Deas, E., Houlden, H., Mehta, A., Hughes, D., Cox, T.M., Deegan, P., *et al.* (2013). The glucocerebrosidase E326K variant predisposes to Parkinson's disease, but does not cause Gaucher's disease. *Mov Disord* 28, 232-236.

Dvir, H., Harel, M., McCarthy, A.A., Toker, L., Silman, I., Futerman, A.H., and Sussman, J.L. (2003). X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Rep* 4, 704-709.

Ejma, M., Madetko, N., Brzecka, A., Guranski, K., Alster, P., Misiuk-Hojto, M., Somasundaram, S.G., Kirkland, C.E., and Aliev, G. (2020). The Links between Parkinson's Disease and Cancer. *Biomedicines* 8.

Enquist, I.B., Lo Bianco, C., Ooka, A., Nilsson, E., Månsson, J.E., Ehinger, M., Richter, J., Brady, R.O., Kirik, D., and Karlsson, S. (2007). Murine models of acute neuronopathic Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17483-17488.

Fabelo, N., Martín, V., Santpere, G., Marín, R., Torrent, L., Ferrer, I., and Díaz, M. (2011). Severe alterations in lipid composition of frontal cortex lipid rafts from Parkinson's disease and incidental Parkinson's disease. *Mol Med* 17, 1107-1118.

Feingold, K.R., and Elias, P.M. (2014). Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochim Biophys Acta* 1841, 280-294.

Fernandes, Hugo J.R., Hartfield, Elizabeth M., Christian, Helen C., Emmanouilidou, E., Zheng, Y., Booth, H., Bogetofte, H., Lang, C., Ryan, Brent J., Sardi, S.P., *et al.* (2016). ER Stress and Autophagic Perturbations Lead to Elevated Extracellular α -Synuclein in GBA-N370S Parkinson's iPSC-Derived Dopamine Neurons. *Stem Cell Reports* 6, 342-356.

Ferraz, M.J., Marques, A.R., Appelman, M.D., Verhoek, M., Strijland, A., Mirzaian, M., Scheij, S., Ouairy, C.M., Lahav, D., Wisse, P., *et al.* (2016). Lysosomal glycosphingolipid catabolism by acid ceramidase: formation of glycosphingoid bases during deficiency of glycosidases. *FEBS Lett* 590, 716-725.

Fleeman, N., Bagust, A., Beale, S., Boland, A., Dickson, R., Dwan, K., Richardson, M., Dundar, Y., Davis, H., and Banks, L. (2015). Dabrafenib for Treating Unresectable, Advanced or Metastatic BRAF V600 Mutation-Positive Melanoma: An Evidence Review Group Perspective. *Pharmacoeconomics* 33, 893-904.

Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M.S., Shen, J., Takio, K., and Iwatsubo, T. (2002). α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 4, 160-164.

Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., and Kroemer, G. (2016). Defective Autophagy Initiates Malignant Transformation. *Mol Cell* 62, 473-474.

Gao, X., Simon, K.C., Han, J., Schwarzschild, M.A., and Ascherio, A. (2009). Family history of melanoma and Parkinson disease risk. *Neurology* 73, 1286-1291.

Garfinkel, D., Sidi, Y., Ben-Bassat, M., Salomon, F., Hazaz, B., and Pinkhas, J. (1982). Coexistence of Gaucher's disease and multiple myeloma. *Arch Intern Med* 142, 2229-2230.

Gaucher, P.C.E. (1882). De l'epithélioma primitif de la rate: hypertrophie idiopathique de la rate sans leucémie.

George, K.S., and Wu, S. (2012). Lipid raft: A floating island of death or survival. *Toxicol Appl Pharmacol* 259, 311-319.

Gershenwald, J.E., and Guy, G.P., Jr. (2016). Stemming the Rising Incidence of Melanoma: Calling Prevention to Action. *J Natl Cancer Inst* 108.

Ghauharali-van der Vlugt, K., Langeveld, M., Poppema, A., Kuiper, S., Hollak, C.E., Aerts, J.M., and Groener, J.E. (2008). Prominent increase in plasma ganglioside GM3 is associated with clinical manifestations of type I Gaucher disease. *Clin Chim Acta* 389, 109-113.

Giasson, B.I., Duda, J.E., Quinn, S.M., Zhang, B., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2002). Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron* 34, 521-533.

Gibbons, C.H., Wang, N., and Freeman, R. (2017). Cutaneous Alpha-Synuclein From Paraffin Embedded Autopsy Specimens in Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis* 7, 503-509.

Glajch, K.E., Moors, T.E., Chen, Y., Bechade, P.A., Nam, A.Y., Rajsombath, M.M., McCaffery, T.D., Dettmer, U., Weihofen, A., Hirst, W.D., *et al.* (2021). Wild-type GBA1 increases the α -synuclein tetramer-monomer ratio, reduces lipid-rich aggregates, and attenuates motor and cognitive deficits in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118.

Goker-Alpan, O., Schiffmann, R., LaMarca, M.E., Nussbaum, R.L., McInerney-Leo, A., and Sidransky, E. (2004). Parkinsonism among Gaucher disease carriers. *J Med Genet* 41, 937-940.

Gong, Y., Fan, Z., Luo, G., Yang, C., Huang, Q., Fan, K., Cheng, H., Jin, K., Ni, Q., Yu, X., *et al.* (2019). The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Mol Cancer* 18, 100.

Gouazé, V., Yu, J.Y., Bleicher, R.J., Han, T.Y., Liu, Y.Y., Wang, H., Gottesman, M.M., Bitterman, A., Giuliano, A.E., and Cabot, M.C. (2004). Overexpression of glucosylceramide synthase and P-glycoprotein in cancer cells selected for resistance to natural product chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 3, 633-639.

Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., and Marais, R. (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445, 851-857.

Grill, C., Bergsteinsdóttir, K., Ogmundsdóttir, M.H., Pogenberg, V., Schepsky, A., Wilmanns, M., Pingault, V., and Steingrímsson, E. (2013). MITF mutations associated with pigment deficiency syndromes and melanoma have different effects on protein function. *Hum Mol Genet* 22, 4357-4367.

Grimaldi, A.M., Simeone, E., and Ascierto, P.A. (2014). The role of MEK inhibitors in the treatment of metastatic melanoma. *Curr Opin Oncol* 26, 196-203.

Groener, J.E.M., Poorthuis, B.J.H.M., Kuiper, S., Hollak, C.E.M., and Aerts, J.M.F.G. (2008). Plasma glucosylceramide and ceramide in type 1 Gaucher disease patients: correlations with disease severity and response to therapeutic intervention. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1781, 72-78.

- Han, T.U., Sam, R., and Sidransky, E. (2020). Small Molecule Chaperones for the Treatment of Gaucher Disease and GBA1-Associated Parkinson Disease. *Front Cell Dev Biol* 8, 271.
- Hartman, M.L. (2020). Non-Apoptotic Cell Death Signaling Pathways in Melanoma. *Int J Mol Sci* 21.
- Hein, L.K., Meikle, P.J., Hopwood, J.J., and Fuller, M. (2007). Secondary sphingolipid accumulation in a macrophage model of Gaucher disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 92, 336-345.
- Hein, L.K., Rozaklis, T., Adams, M.K., Hopwood, J.J., and Karageorgos, L. (2017). Lipid composition of microdomains is altered in neuronopathic Gaucher disease sheep brain and spleen. *Mol Genet Metab* 121, 259-270.
- Henderson, M.X., Sedor, S., McGeary, I., Cornblath, E.J., Peng, C., Riddle, D.M., Li, H.L., Zhang, B., Brown, H.J., Olufemi, M.F., *et al.* (2020). Glucocerebrosidase Activity Modulates Neuronal Susceptibility to Pathological α -Synuclein Insult. *Neuron* 105, 822-836.e827.
- Hetz, C., and Papa, F.R. (2018). The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell* 69, 169-181.
- Heybrock, S., Kanerva, K., Meng, Y., Ing, C., Liang, A., Xiong, Z.-J., Weng, X., Ah Kim, Y., Collins, R., Trimble, W., *et al.* (2019). Lysosomal integral membrane protein-2 (LIMP-2/SCARB2) is involved in lysosomal cholesterol export. *Nature Communications* 10.
- Hill, V.K., Gartner, J.J., Samuels, Y., and Goldstein, A.M. (2013). The genetics of melanoma: recent advances. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 14, 257-279.
- Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., *et al.* (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363, 711-723.
- Hollak, C.E., van Weely, S., van Oers, M.H., and Aerts, J.M. (1994). Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest* 93, 1288-1292.
- Hou, J., Ju, J., Zhang, Z., Zhao, C., Li, Z., Zheng, J., Sheng, T., Zhang, H., Hu, L., Yu, X., *et al.* (2019). Discovery of potent necroptosis inhibitors targeting RIPK1 kinase activity for the treatment of inflammatory disorder and cancer metastasis. *Cell Death Dis* 10, 493.
- Hruska, K.S., LaMarca, M.E., Scott, C.R., and Sidransky, E. (2008). Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Hum Mutat* 29, 567-583.
- Ichikawa, S., and Hirabayashi, Y. (1998). Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol* 8, 198-202.
- Ijichi, K., Brown, G.D., Moore, C.S., Lee, J.P., Winokur, P.N., Pagarigan, R., Snyder, E.Y., Bongarzone, E.R., and Crocker, S.J. (2013). MMP-3 mediates psychosine-induced globoid cell formation: implications for leukodystrophy pathology. *Glia* 61, 765-777.
- Im, D.S., Heise, C.E., Nguyen, T., O'Dowd, B.F., and Lynch, K.R. (2001). Identification of a molecular target of psychosine and its role in globoid cell formation. *J Cell Biol* 153, 429-434.
- INCA (2021). <Panorama des cancers en France_2021.pdf>.
- Inzelberg, R., Flash, S., Friedman, E., and Azizi, E. (2016). Cutaneous malignant melanoma and Parkinson disease: Common pathways? *Ann Neurol* 80, 811-820.
- Ishibashi, Y., Kohyama-Koganeya, A., and Hirabayashi, Y. (2013). New insights on glucosylated lipids: metabolism and functions. *Biochim Biophys Acta* 1831, 1475-1485.

Israeli, E., Yakunin, E., Zarbiv, Y., Hacoheh-Solovitch, A., Kisos, H., Loeb, V., Lichtenstein, M., Ben-Gedalya, T., Sabag, O., Pikarsky, E., *et al.* (2011). α -Synuclein expression selectively affects tumorigenesis in mice modeling Parkinson's disease. *PLoS ONE* 6, e19622.

Ivanova, M., Limgala, R.P., Changsila, E., Kamath, R., Ioanou, C., and Goker-Alpan, O. (2018). Gaucheromas: When macrophages promote tumor formation and dissemination. *Blood Cells Mol Dis* 68, 100-105.

Ivanova, M.M., Changsila, E., Ioanou, C., and Goker-Alpan, O. (2019). Impaired autophagic and mitochondrial functions are partially restored by ERT in Gaucher and Fabry diseases. *PLoS ONE* 14, e0210617.

Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., and Minato, N. (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12293-12297.

Jaffe, D.H., Flaks-Manov, N., Benis, A., Gabay, H., DiBonaventura, M., Rosenbaum, H., Joseph, A., Bachrach, A., and Leventer-Roberts, M. (2019). Population-based cohort of 500 patients with Gaucher disease in Israel. *BMJ Open* 9, e024251.

Jain, M., and De Jesus, O. (2021). Krabbe Disease. In *StatPearls (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.)*.

James, S.P., Stromeyer, F.W., Chang, C., and Barranger, J.A. (1981). Liver abnormalities in patients with Gaucher's disease. *Gastroenterology* 80, 126-133.

Jankovic, J., and Tan, E.K. (2020). Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 91, 795-808.

Jmoudiak, M., and Futerman, A.H. (2005). Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management. *Br J Haematol* 129, 178-188.

Kalia, L.V., and Lang, A.E. (2015). Parkinson's disease. *Lancet* 386, 896-912.

Kanazawa, T., Nakamura, S., Momoi, M., Yamaji, T., Takematsu, H., Yano, H., Sabe, H., Yamamoto, A., Kawasaki, T., and Kozutsumi, Y. (2000). Inhibition of cytokinesis by a lipid metabolite, psychosine. *The Journal of Cell Biology* 149, 943-950.

Kartha, R.V., Terluk, M.R., Brown, R., Travis, A., Mishra, U.R., Rudser, K., Lau, H., Jarnes, J.R., Cloyd, J.C., and Weinreb, N.J. (2020). Patients with Gaucher disease display systemic oxidative stress dependent on therapy status. *Mol Genet Metab Rep* 25, 100667.

Kawakami, A., and Fisher, D.E. (2017). The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology. *Lab Invest* 97, 649-656.

Kim, S., Yun, S.P., Lee, S., Umanah, G.E., Bandaru, V.V.R., Yin, X., Rhee, P., Karuppagounder, S.S., Kwon, S.-H., Lee, H., *et al.* (2018). GBA1 deficiency negatively affects physiological α -synuclein tetramers and related multimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, 798-803.

Kinghorn, K.J., Grönke, S., Castillo-Quan, J.I., Woodling, N.S., Li, L., Sirka, E., Gegg, M., Mills, K., Hardy, J., Bjedov, I., *et al.* (2016). A Drosophila Model of Neuronopathic Gaucher Disease Demonstrates Lysosomal-Autophagic Defects and Altered mTOR Signalling and Is Functionally Rescued by Rapamycin. *J Neurosci* 36, 11654-11670.

Kitatani, K., Idkowiak-Baldys, J., Bielawski, J., Taha, T.A., Jenkins, R.W., Senkal, C.E., Ogretmen, B., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (2006). Protein kinase C-induced activation of a ceramide/protein phosphatase 1 pathway leading to dephosphorylation of p38 MAPK. *J Biol Chem* 281, 36793-36802.

Kitatani, K., Sheldon, K., Anelli, V., Jenkins, R.W., Sun, Y., Grabowski, G.A., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (2009a). Acid beta-glucosidase 1 counteracts p38delta-dependent induction of interleukin-6: possible role for ceramide as an anti-inflammatory lipid. *J Biol Chem* 284, 12979-12988.

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

Kitatani, K., Wada, M., Perry, D., Usui, T., Sun, Y., Obeid, L.M., Yaegashi, N., Grabowski, G.A., and Hannun, Y.A. (2015). Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Gaucher's Disease. *PLoS ONE* 10, e0136633.

Koch, J.C., Bitow, F., Haack, J., d'Hedouville, Z., Zhang, J.N., Tönges, L., Michel, U., Oliveira, L.M., Jovin, T.M., Liman, J., *et al.* (2015). Alpha-Synuclein affects neurite morphology, autophagy, vesicle transport and axonal degeneration in CNS neurons. *Cell Death Dis* 6, e1811.

Kolter, T., and Sandhoff, K. (2010). Lysosomal degradation of membrane lipids. *FEBS Lett* 584, 1700-1712.

Konovalova, E.V., Lopacheva, O.M., Grivennikov, I.A., Lebedeva, O.S., Dashinimaev, E.B., Khaspekov, L.G., Fedotova, E.Y., and Illarioshkin, S.N. (2015). Mutations in the Parkinson's Disease-Associated PARK2 Gene Are Accompanied by Imbalance in Programmed Cell Death Systems. *Acta Naturae* 7, 146-149.

Kordower, J.H., Chu, Y., Hauser, R.A., Freeman, T.B., and Olanow, C.W. (2008). Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med* 14, 504-506.

Körschen, H.G., Yildiz, Y., Raju, D.N., Schonauer, S., Bönigk, W., Jansen, V., Kremmer, E., Kaupp, U.B., and Wachten, D. (2013). The non-lysosomal β -glucosidase GBA2 is a non-integral membrane-associated protein at the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi. *J Biol Chem* 288, 3381-3393.

Kramer, G., Wegdam, W., Donker-Koopman, W., Ottenhoff, R., Gaspar, P., Verhoek, M., Nelson, J., Gabriel, T., Kallemeijn, W., Boot, R.G., *et al.* (2016). Elevation of glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B in type 1 Gaucher disease patients and mouse models. *FEBS Open Bio* 6, 902-913.

Kumar, S.T., Jagannath, S., Francois, C., Vanderstichele, H., Stoops, E., and Lashuel, H.A. (2020). How specific are the conformation-specific α -synuclein antibodies? Characterization and validation of 16 α -synuclein conformation-specific antibodies using well-characterized preparations of α -synuclein monomers, fibrils and oligomers with distinct structures and morphology. *Neurobiol Dis* 146, 105086.

Kumari, N., Dwarakanath, B.S., Das, A., and Bhatt, A.N. (2016). Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol* 37, 11553-11572.

Kunz, M., Löffler-Wirth, H., Dannemann, M., Willscher, E., Doose, G., Kelso, J., Kotteck, T., Nickel, B., Hopp, L., Landsberg, J., *et al.* (2018). RNA-seq analysis identifies different transcriptomic types and developmental trajectories of primary melanomas. *Oncogene* 37, 6136-6151.

Kuo, C.L., Kallemeijn, W.W., Lelieveld, L.T., Mirzaian, M., Zoutendijk, I., Vardi, A., Futerman, A.H., Meijer, A.H., Spaink, H.P., Overkleeft, H.S., *et al.* (2019). In vivo inactivation of glycosidases by conduritol B epoxide and cyclophellitol as revealed by activity-based protein profiling. *Febs j* 286, 584-600.

Lai, M., Amato, R., La Rocca, V., Bilgin, M., Freer, G., Spezia, P., Quaranta, P., Piomelli, D., and Pistello, M. (2021). Acid ceramidase controls apoptosis and increases autophagy in human melanoma cells treated with doxorubicin. *Sci Rep* 11, 11221.

Lai, M., Realini, N., La Ferla, M., Passalacqua, I., Matteoli, G., Ganesan, A., Pistello, M., Mazzanti, C.M., and Piomelli, D. (2017). Complete Acid Ceramidase ablation prevents cancer-initiating cell formation in melanoma cells. *Sci Rep* 7, 7411.

Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 178-196.

Landgren, O., Turesson, I., Gridley, G., and Caporaso, N.E. (2007). Risk of malignant disease among 1525 adult male US Veterans with Gaucher disease. *Arch Intern Med* 167, 1189-1194.

Le Barz, M., Vors, C., Combe, E., Joumard-Cubizolles, L., Lecomte, M., Joffre, F., Trauchessec, M., Pesenti, S., Loizon, E., Breyton, A.E., *et al.* (2021). Milk polar lipids favorably alter circulating and intestinal ceramide and sphingomyelin species in postmenopausal women. *JCI Insight* 6.

Leach, D.R., Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271, 1734-1736.

Leclerc, J., Garandeau, D., Pandiani, C., Gaudel, C., Bille, K., Nottet, N., Garcia, V., Colosetti, P., Pagnotta, S., Bahadoran, P., *et al.* (2019). Lysosomal acid ceramidase ASAH1 controls the transition between invasive and proliferative phenotype in melanoma cells. *Oncogene* 38, 1282-1295.

Lee, B.R., Matsuo, Y., Cashikar, A.G., and Kamitani, T. (2013). Role of Ser129 phosphorylation of α -synuclein in melanoma cells. *J Cell Sci* 126, 696-704.

Lelieveld, L.T., Mirzaian, M., Kuo, C.L., Artola, M., Ferraz, M.J., Peter, R.E.A., Akiyama, H., Greimel, P., van den Berg, R., Overkleeft, H.S., *et al.* (2019). Role of β -glucosidase 2 in aberrant glycosphingolipid metabolism: model of glucocerebrosidase deficiency in zebrafish. *J Lipid Res* 60, 1851-1867.

Lens, S.M.A., and Medema, R.H. (2019). Cytokinesis defects and cancer. *Nature Reviews Cancer* 19, 32-45.

Li, S., Song, Y., Quach, C., Guo, H., Jang, G.-B., Maazi, H., Zhao, S., Sands, N.A., Liu, Q., In, G.K., *et al.* (2019). Transcriptional regulation of autophagy-lysosomal function in BRAF-driven melanoma progression and chemoresistance. *Nature Communications* 10, 1693.

Lieberman, R.L. (2011). A Guided Tour of the Structural Biology of Gaucher Disease: Acid- β -Glucosidase and Saposin C. *Enzyme Res* 2011, 973231.

Lin, J.Y., and Fisher, D.E. (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445, 843-850.

Liou, B., Zhang, W., Fannin, V., Quinn, B., Ran, H., Xu, K., Setchell, K.D.R., Witte, D., Grabowski, G.A., and Sun, Y. (2019). Combination of acid β -glucosidase mutation and Saposin C deficiency in mice reveals Gba1 mutation dependent and tissue-specific disease phenotype. *Sci Rep* 9, 5571.

Liu, J., Halene, S., Yang, M., Iqbal, J., Yang, R., Mehal, W.Z., Chuang, W.-L., Jain, D., Yuen, T., Sun, L., *et al.* (2012). Gaucher disease gene GBA functions in immune regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 10018-10023.

Lo, J.A., and Fisher, D.E. (2014). The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science* 346, 945-949.

Lo, S.M., Stein, P., Mullaly, S., Bar, M., Jain, D., Pastores, G.M., and Mistry, P.K. (2010). Expanding spectrum of the association between Type 1 Gaucher disease and cancers: a series of patients with up to 3 sequential cancers of multiple types--correlation with genotype and phenotype. *Am J Hematol* 85, 340-345.

Lu, W., and Kang, Y. (2019). Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. *Dev Cell* 49, 361-374.

- Lukas, J., Cozma, C., Yang, F., Kramp, G., Meyer, A., Neßlauer, A.-M., Eichler, S., Böttcher, T., Witt, M., Bräuer, A., *et al.* (2017). Glucosylsphingosine Causes Hematological and Visceral Changes in Mice—Evidence for a Pathophysiological Role in Gaucher Disease. *Int J Mol Sci* *18*, 2192.
- Luke, J.J., Flaherty, K.T., Ribas, A., and Long, G.V. (2017). Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol* *14*, 463-482.
- Magnuson, B., Ekim, B., and Fingar, D.C. (2012). Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J* *441*, 1-21.
- Malvi, P., Janostiak, R., Nagarajan, A., Zhang, X., and Wajapeyee, N. (2021). N-acylsphingosine amidohydrolase 1 promotes melanoma growth and metastasis by suppressing peroxisome biogenesis-induced ROS production. *Mol Metab* *48*, 101217.
- Maor, G., Rencus-Lazar, S., Filocamo, M., Steller, H., Segal, D., and Horowitz, M. (2013). Unfolded protein response in Gaucher disease: from human to *Drosophila*. *Orphanet J Rare Dis* *8*, 140.
- Marques, A.R.A., Mirzaian, M., Akiyama, H., Wisse, P., Ferraz, M.J., Gaspar, P., Ghauharali-van der Vlugt, K., Meijer, R., Giraldo, P., Alfonso, P., *et al.* (2016). Glucosylated cholesterol in mammalian cells and tissues: formation and degradation by multiple cellular β -glucosidases. *J Lipid Res* *57*, 451-463.
- Marshall, J., McEachern, K.A., Chuang, W.-L., Hutto, E., Siegel, C.S., Shayman, J.A., Grabowski, G.A., Scheule, R.K., Copeland, D.P., and Cheng, S.H. (2010). Improved management of lysosomal glucosylceramide levels in a mouse model of type 1 Gaucher disease using enzyme and substrate reduction therapy. *Journal of Inherited Metabolic Disease* *33*, 281-289.
- Massaro, G., Hughes, M.P., Whaler, S.M., Wallom, K.L., Priestman, D.A., Platt, F.M., Waddington, S.N., and Rahim, A.A. (2020). Systemic AAV9 gene therapy using the synapsin I promoter rescues a mouse model of neuronopathic Gaucher disease but with limited cross-correction potential to astrocytes. *Hum Mol Genet* *29*, 1933-1949.
- Matsuo, Y., and Kamitani, T. (2010). Parkinson's disease-related protein, alpha-synuclein, in malignant melanoma. *PLoS ONE* *5*, e10481.
- Mazzulli, J.R., Xu, Y.-H., Sun, Y., Knight, A.L., McLean, P.J., Caldwell, G.A., Sidransky, E., Grabowski, G.A., and Krainc, D. (2011). Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell* *146*, 37-52.
- McArthur, G.A., Chapman, P.B., Robert, C., Larkin, J., Haanen, J.B., Dummer, R., Ribas, A., Hogg, D., Hamid, O., Ascierto, P.A., *et al.* (2014). Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol* *15*, 323-332.
- Michelakakis, H., Spanou, C., Kondyli, A., Dimitriou, E., Van Weely, S., Hollak, C.E., Van Oers, M.H., and Aerts, J.M. (1996). Plasma tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels in Gaucher disease. *Biochimica Et Biophysica Acta* *1317*, 219-222.
- Mistry, P.K., Liu, J., Sun, L., Chuang, W.-L., Yuen, T., Yang, R., Lu, P., Zhang, K., Li, J., Keutzer, J., *et al.* (2014). Glucocerebrosidase 2 gene deletion rescues type 1 Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci USA* *111*, 4934-4939.
- Mistry, P.K., Liu, J., Yang, M., Nottoli, T., McGrath, J., Jain, D., Zhang, K., Keutzer, J., Chuang, W.-L., Mehal, W.Z., *et al.* (2010). Glucocerebrosidase gene-deficient mouse recapitulates Gaucher disease displaying cellular and molecular dysregulation beyond the macrophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *107*, 19473-19478.

- Mizukami, H., Mi, Y., Wada, R., Kono, M., Yamashita, T., Liu, Y., Werth, N., Sandhoff, R., Sandhoff, K., and Proia, R.L. (2002). Systemic inflammation in glucocerebrosidase-deficient mice with minimal glucosylceramide storage. *J Clin Invest* *109*, 1215-1221.
- Murugesan, V., Lischuk, A., Haims, A., Lackman, R., Brooks, J.S., Mankin, H., and Mistry, P.K. (2016). Case series and literature review of skeletal tumors and their incidence in the Gaucher disease population. *Am J Hematol* *91*, 736-741.
- Murugesan, V., Liu, J., Yang, R., Lin, H., Lischuk, A., Pastores, G., Zhang, X., Chuang, W.L., and Mistry, P.K. (2018). Validating glycoprotein non-metastatic melanoma B (gpNMB, osteoactivin), a new biomarker of Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* *68*, 47-53.
- Nagata, M., Izumi, Y., Ishikawa, E., Kiyotake, R., Doi, R., Iwai, S., Omahdi, Z., Yamaji, T., Miyamoto, T., Bamba, T., *et al.* (2017). Intracellular metabolite β -glucosylceramide is an endogenous Mincle ligand possessing immunostimulatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* *114*, E3285-E3294.
- Nair, S., Boddupalli, C.S., Verma, R., Liu, J., Yang, R., Pastores, G.M., Mistry, P.K., and Dhodapkar, M.V. (2015). Type II NKT-TFH cells against Gaucher lipids regulate B-cell immunity and inflammation. *Blood* *125*, 1256-1271.
- Nair, S., Branagan, A.R., Liu, J., Boddupalli, C.S., Mistry, P.K., and Dhodapkar, M.V. (2016). Clonal Immunoglobulin against Lysolipids in the Origin of Myeloma. *New England Journal of Medicine* *374*, 555-561.
- Nair, S., Sng, J., Boddupalli, C.S., Seckinger, A., Chesi, M., Fulciniti, M., Zhang, L., Rauniyar, N., Lopez, M., Neparidze, N., *et al.* (2018). Antigen-mediated regulation in monoclonal gammopathies and myeloma. *JCI Insight* *3*.
- Nalysnyk, L., Rotella, P., Simeone, J.C., Hamed, A., and Weinreb, N. (2017). Gaucher disease epidemiology and natural history: a comprehensive review of the literature. *Hematology* *22*, 65-73.
- Nandakumar, S., Vijayan, B., Kishore, A., and Thekkuveetil, A. (2017). Autophagy enhancement is rendered ineffective in presence of α -synuclein in melanoma cells. *J Cell Commun Signal* *11*, 381-394.
- Narita, A., Shirai, K., Itamura, S., Matsuda, A., Ishihara, A., Matsushita, K., Fukuda, C., Kubota, N., Takayama, R., Shigematsu, H., *et al.* (2016). Ambroxol chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease: A pilot study. *Ann Clin Transl Neurol* *3*, 200-215.
- Nguyen, Y., Stirnemann, J., and Belmatoug, N. (2019). [Gaucher disease: A review]. *Rev Med Interne* *40*, 313-322.
- Nieto, M.A. (2013). Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science* *342*, 1234850.
- Nilsson, O., Mansson, J.-E., Hakansson, G., and Svennerholm, L. (1982). The occurrence of psychosine and other glycolipids in spleen and liver from the three major types of Gaucher's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* *712*, 453-463.
- Nilsson, O., and Svennerholm, L. (1982). Accumulation of glucosylceramide and glucosylsphingosine (psychosine) in cerebrum and cerebellum in infantile and juvenile Gaucher disease. *J Neurochem* *39*, 709-718.
- Ogretmen, B. (2018). Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nat Rev Cancer* *18*, 33-50.

- Okazaki, H., Lipkin, L.E., and Aronson, S.M. (1961). Diffuse intracytoplasmic ganglionic inclusions (Lewy type) associated with progressive dementia and quadriplegia in flexion. *J Neuropathol Exp Neurol* 20, 237-244.
- Olsen, J.H., Friis, S., and Frederiksen, K. (2006). Malignant melanoma and other types of cancer preceding Parkinson disease. *Epidemiology* 17, 582-587.
- Olsen, J.H., Friis, S., Frederiksen, K., McLaughlin, J.K., Mellekjær, L., and Møller, H. (2005). Atypical cancer pattern in patients with Parkinson's disease. *Br J Cancer* 92, 201-205.
- Orvisky, E., Park, J.K., LaMarca, M.E., Ginns, E.I., Martin, B.M., Tayebi, N., and Sidransky, E. (2002). Glucosylsphingosine accumulation in tissues from patients with Gaucher disease: correlation with phenotype and genotype. *Mol Genet Metab* 76, 262-270.
- Orvisky, E., Sidransky, E., McKinney, C.E., Lamarca, M.E., Samimi, R., Krasnewich, D., Martin, B.M., and Ginns, E.I. (2000). Glucosylsphingosine accumulation in mice and patients with type 2 Gaucher disease begins early in gestation. *Pediatr Res* 48, 233-237.
- Pan, T., Zhu, J., Hwu, W.-J., and Jankovic, J. (2012). The Role of Alpha-Synuclein in Melanin Synthesis in Melanoma and Dopaminergic Neuronal Cells. *PLoS ONE* 7, e45183.
- Pandey, M.K., Burrow, T.A., Rani, R., Martin, L.J., Witte, D., Setchell, K.D., McKay, M.A., Magnusen, A.F., Zhang, W., Liou, B., *et al.* (2017). Complement drives glucosylceramide accumulation and tissue inflammation in Gaucher disease. *Nature* 543, 108-112.
- Pandey, M.K., Jabre, N.A., Xu, Y.-H., Zhang, W., Setchell, K.D.R., and Grabowski, G.A. (2014). Gaucher disease: chemotactic factors and immunological cell invasion in a mouse model. *Molecular Genetics and Metabolism* 111, 163-171.
- Pandey, M.K., Rani, R., Zhang, W., Setchell, K., and Grabowski, G.A. (2012). Immunological cell type characterization and Th1-Th17 cytokine production in a mouse model of Gaucher disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 106, 310-322.
- Park, Sung M., Ou, J., Chamberlain, L., Simone, Tessa M., Yang, H., Virbasius, C.-M., Ali, Abdullah M., Zhu, Lihua J., Mukherjee, S., Raza, A., *et al.* (2016). U2AF35(S34F) Promotes Transformation by Directing Aberrant ATG7 Pre-mRNA 3' End Formation. *Mol Cell* 62, 479-490.
- Pastores, G.M., Shankar, S.P., Petakov, M., Giraldo, P., Rosenbaum, H., Amato, D.J., Szer, J., Chertkoff, R., Brill-Almon, E., and Zimran, A. (2016). Enzyme replacement therapy with taliglucerase alfa: 36-month safety and efficacy results in adult patients with Gaucher disease previously treated with imiglucerase. *Am J Hematol* 91, 661-665.
- Pavan, E., Ormazabal, M., Peruzzo, P., Vaena, E., Rozenfeld, P., and Dardis, A. (2020). CRISPR/Cas9 Editing for Gaucher Disease Modelling. *Int J Mol Sci* 21.
- Pavan, W.J., and Raible, D.W. (2012). Specification of neural crest into sensory neuron and melanocyte lineages. *Dev Biol* 366, 55-63.
- Pavlova, E.V., Archer, J., Wang, S., Dekker, N., Aerts, J.M., Karlsson, S., and Cox, T.M. (2015). Inhibition of UDP-glucosylceramide synthase in mice prevents Gaucher disease-associated B-cell malignancy. *J Pathol* 235, 113-124.
- Pavlova, E.V., Wang, S.Z., Archer, J., Dekker, N., Aerts, J.M.F.G., Karlsson, S., and Cox, T.M. (2013). B cell lymphoma and myeloma in murine Gaucher's disease. *J Pathol* 231, 88-97.

- Pellerin, L., Carrié, L., Dufau, C., Nieto, L., Ségui, B., Levade, T., Riond, J., and Andrieu-Abadie, N. (2020). Lipid metabolic Reprogramming: Role in Melanoma Progression and Therapeutic Perspectives. *Cancers (Basel)* *12*.
- Peterschmitt, M.J., Crawford, N.P.S., Gaemers, S.J.M., Ji, A.J., Sharma, J., and Pham, T.T. (2021). Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Safety, and Tolerability of Oral Venglustat in Healthy Volunteers. *Clin Pharmacol Drug Dev* *10*, 86-98.
- Pettazzoni, M., Froissart, R., Pagan, C., Vanier, M.T., Ruet, S., Latour, P., Guffon, N., Fouilhoux, A., Germain, D.P., Levade, T., *et al.* (2017). LC-MS/MS multiplex analysis of lysosphingolipids in plasma and amniotic fluid: A novel tool for the screening of sphingolipidoses and Niemann-Pick type C disease. *PLoS ONE* *12*, e0181700.
- Platt, F.M., d'Azzo, A., Davidson, B.L., Neufeld, E.F., and Tifft, C.J. (2018). Lysosomal storage diseases. *Nat Rev Dis Primers* *4*, 27.
- Pleasance, E.D., Cheetham, R.K., Stephens, P.J., McBride, D.J., Humphray, S.J., Greenman, C.D., Varela, I., Lin, M.L., Ordóñez, G.R., Bignell, G.R., *et al.* (2010). A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* *463*, 191-196.
- Ploper, D., and De Robertis, E.M. (2015). The MITF family of transcription factors: Role in endolysosomal biogenesis, Wnt signaling, and oncogenesis. *Pharmacol Res* *99*, 36-43.
- PNDS (2015). Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS)Maladie de Gaucher.
- Pópulo, H., Soares, P., Faustino, A., Rocha, A.S., Silva, P., Azevedo, F., and Lopes, J.M. (2011). mTOR pathway activation in cutaneous melanoma is associated with poorer prognosis characteristics. *Pigment Cell & Melanoma Research* *24*, 254-257.
- Pouryazdanparast, P., Newman, M., Mafee, M., Guitart, J., and Gerami, P. (2009). Malignant melanoma with monster cells showing massive cyclin D1 amplification. *Am J Dermatopathol* *31*, 402-403.
- Puschmann, A. (2013). Monogenic Parkinson's disease and parkinsonism: clinical phenotypes and frequencies of known mutations. *Parkinsonism Relat Disord* *19*, 407-415.
- Puzanov, I., Amaravadi, R.K., McArthur, G.A., Flaherty, K.T., Chapman, P.B., Sosman, J.A., Ribas, A., Shackleton, M., Hwu, P., Chmielowski, B., *et al.* (2015). Long-term outcome in BRAF(V600E) melanoma patients treated with vemurafenib: Patterns of disease progression and clinical management of limited progression. *Eur J Cancer* *51*, 1435-1443.
- Radu, C.G., Cheng, D., Nijagal, A., Riedinger, M., McLaughlin, J., Yang, L.V., Johnson, J., and Witte, O.N. (2006). Normal immune development and glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in mice deficient for the T-cell death-associated gene 8 receptor. *Mol Cell Biol* *26*, 668-677.
- Raghavan, S.S., Mumford, R.A., and Kanfer, J.N. (1974). Isolation and characterization of glucosylsphingosine from Gaucher's spleen. *J Lipid Res* *15*, 484-490.
- Read, J., Wadt, K.A., and Hayward, N.K. (2016). Melanoma genetics. *J Med Genet* *53*, 1-14.
- Realini, N., Palese, F., Pizzirani, D., Pontis, S., Basit, A., Bach, A., Ganesan, A., and Piomelli, D. (2016). Acid Ceramidase in Melanoma: EXPRESSION, LOCALIZATION, AND EFFECTS OF PHARMACOLOGICAL INHIBITION. *J Biol Chem* *291*, 2422-2434.
- Reczek, D., Schwake, M., Schröder, J., Hughes, H., Blanz, J., Jin, X., Brondyk, W., Van Patten, S., Edmunds, T., and Saftig, P. (2007). LIMP-2 Is a Receptor for Lysosomal Mannose-6-Phosphate-Independent Targeting of β -Glucocerebrosidase. *Cell* *131*, 770-783.

- Reed, M.C., Schiffer, C., Heales, S., Mehta, A.B., and Hughes, D.A. (2018). Impact of sphingolipids on osteoblast and osteoclast activity in Gaucher disease. *Mol Genet Metab* 124, 278-286.
- Rees, J.L. (2003). Genetics of hair and skin color. *Annu Rev Genet* 37, 67-90.
- Revel-Vilk, S., Fuller, M., and Zimran, A. (2020). Value of Glucosylsphingosine (Lyso-Gb1) as a Biomarker in Gaucher Disease: A Systematic Literature Review. *Int J Mol Sci* 21.
- Richard, G., Dalle, S., Monet, M.A., Ligier, M., Boespflug, A., Pommier, R.M., de la Fouchardière, A., Perier-Muzet, M., Depaepe, L., Barnault, R., *et al.* (2016). ZEB1-mediated melanoma cell plasticity enhances resistance to MAPK inhibitors. *EMBO Mol Med* 8, 1143-1161.
- Rinnerthaler, M., Duschl, J., Steinbacher, P., Salzmann, M., Bischof, J., Schuller, M., Wimmer, H., Peer, T., Bauer, J.W., and Richter, K. (2013). Age-related changes in the composition of the cornified envelope in human skin. *Exp Dermatol* 22, 329-335.
- Robert, C., Grob, J.J., Stroyakovskiy, D., Karaszewska, B., Hauschild, A., Levchenko, E., Chiarion Sileni, V., Schachter, J., Garbe, C., Bondarenko, I., *et al.* (2019). Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* 381, 626-636.
- Robert, C., Karaszewska, B., Schachter, J., Rutkowski, P., Mackiewicz, A., Stroiakovski, D., Lichinitser, M., Dummer, R., Grange, F., Mortier, L., *et al.* (2015a). Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med* 372, 30-39.
- Robert, C., Long, G.V., Brady, B., Dutriaux, C., Maio, M., Mortier, L., Hassel, J.C., Rutkowski, P., McNeil, C., Kalinka-Warzocho, E., *et al.* (2015b). Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* 372, 320-330.
- Rodriguez-Leyva, I., Chi-Ahumada, E., Mejía, M., Castanedo-Cazares, J.P., Eng, W., Saikaly, S.K., Carrizales, J., Levine, T.D., Norman, R.A., and Jimenez-Capdeville, M.E. (2017). The Presence of Alpha-Synuclein in Skin from Melanoma and Patients with Parkinson's Disease. *Mov Disord Clin Pract* 4, 724-732.
- Rolfs, A., Giese, A.K., Grittner, U., Mascher, D., Elstein, D., Zimran, A., Böttcher, T., Lukas, J., Hübner, R., Gölnitz, U., *et al.* (2013). Glucosylsphingosine is a highly sensitive and specific biomarker for primary diagnostic and follow-up monitoring in Gaucher disease in a non-Jewish, Caucasian cohort of Gaucher disease patients. *PLoS ONE* 8, e79732.
- Ron, I., and Horowitz, M. (2005). ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity. *Hum Mol Genet* 14, 2387-2398.
- Ron, I., Rapaport, D., and Horowitz, M. (2010). Interaction between parkin and mutant glucocerebrosidase variants: a possible link between Parkinson disease and Gaucher disease. *Hum Mol Genet* 19, 3771-3781.
- Rosenbloom, B.E., Weinreb, N.J., Zimran, A., Kacena, K.A., Charrow, J., and Ward, E. (2005). Gaucher disease and cancer incidence: a study from the Gaucher Registry. *Blood* 105, 4569-4572.
- Saini, G., Joshi, S., Garlapati, C., Li, H., Kong, J., Krishnamurthy, J., Reid, M.D., and Aneja, R. (2021). Polyploid giant cancer cell characterization: New frontiers in predicting response to chemotherapy in breast cancer. *Semin Cancer Biol*.
- Schiaffino, M.V. (2010). Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 1094-1104.

- Schiffer, V., Santiago-Mujika, E., Flunkert, S., Schmidt, S., Farcher, M., Loeffler, T., Schilcher, I., Posch, M., Neddens, J., Sun, Y., *et al.* (2020). Characterization of the visceral and neuronal phenotype of 4L/PS-NA mice modeling Gaucher disease. *PLoS ONE* *15*, e0227077.
- Schonauer, S., Körschen, H.G., Penno, A., Rennhack, A., Breiden, B., Sandhoff, K., Gutbrod, K., Dörmann, P., Raju, D.N., Haberkant, P., *et al.* (2017). Identification of a feedback loop involving β -glucosidase 2 and its product sphingosine sheds light on the molecular mechanisms in Gaucher disease. *J Biol Chem* *292*, 6177-6189.
- Schröder, B., Wrocklage, C., Pan, C., Jäger, R., Kösters, B., Schäfer, H., Elsässer, H.P., Mann, M., and Hasilik, A. (2007). Integral and associated lysosomal membrane proteins. *Traffic* *8*, 1676-1686.
- Schueler, U.H., Kolter, T., Kaneski, C.R., Blusztajn, J.K., Herkenham, M., Sandhoff, K., and Brady, R.O. (2003). 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*, 595-601.
- Schulze, H., and Sandhoff, K. (2011). Lysosomal lipid storage diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *3*.
- Schulze, H., and Sandhoff, K. (2014). Sphingolipids and lysosomal pathologies. *Biochim Biophys Acta* *1841*, 799-810.
- Seiberg, M. (2001). Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. *Pigment Cell Res* *14*, 236-242.
- Seifert, L., Werba, G., Tiwari, S., Giao Ly, N.N., Alothman, S., Alqunaibit, D., Avanzi, A., Barilla, R., Daley, D., Greco, S.H., *et al.* (2016). The necrosome promotes pancreatic oncogenesis via CXCL1 and Mincle-induced immune suppression. *Nature* *532*, 245-249.
- Seo, J., and Park, M. (2020). Molecular crosstalk between cancer and neurodegenerative diseases. *Cell Mol Life Sci* *77*, 2659-2680.
- Shekoohi, S., Rajasekaran, S., Patel, D., Yang, S., Liu, W., Huang, S., Yu, X., and Witt, S.N. (2021). Knocking out alpha-synuclein in melanoma cells dysregulates cellular iron metabolism and suppresses tumor growth. *Sci Rep* *11*, 5267.
- Shiran, A., Brenner, B., Laor, A., and Tatarsky, I. (1993). Increased risk of cancer in patients with Gaucher disease. *Cancer* *72*, 219-224.
- Sidransky, E., Nalls, M.A., Aasly, J.O., Aharon-Peretz, J., Annesi, G., Barbosa, E.R., Bar-Shira, A., Berg, D., Bras, J., Brice, A., *et al.* (2009). Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* *361*, 1651-1661.
- Simon, D.K., Tanner, C.M., and Brundin, P. (2020). Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clin Geriatr Med* *36*, 1-12.
- Singh, N., Baby, D., Rajguru, J.P., Patil, P.B., Thakkannavar, S.S., and Pujari, V.B. (2019). Inflammation and cancer. *Ann Afr Med* *18*, 121-126.
- Singh, S.S., Vats, S., Chia, A.Y.-Q., Tan, T.Z., Deng, S., Ong, M.S., Arfuso, F., Yap, C.T., Goh, B.C., Sethi, G., *et al.* (2018). Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene* *37*, 1142-1158.
- Sladden, M.J., Nieweg, O.E., Howle, J., Coventry, B.J., and Thompson, J.F. (2018). Updated evidence-based clinical practice guidelines for the diagnosis and management of melanoma: definitive excision margins for primary cutaneous melanoma. *Med J Aust* *208*, 137-142.
- Smith, N.J.C., Fuller, M., Saville, J.T., and Cox, T.M. (2018). Reduced cerebral vascularization in experimental neuronopathic Gaucher disease. *J Pathol* *244*, 120-128.

- Solit, D.B., and Rosen, N. (2011). Resistance to BRAF inhibition in melanomas. *N Engl J Med* 364, 772-774.
- Somaraju, U.R., and Tadepalli, K. (2017). Hematopoietic stem cell transplantation for Gaucher disease. *Cochrane Database Syst Rev* 10, Cd006974.
- Sorge, J., West, C., Westwood, B., and Beutler, E. (1985). Molecular cloning and nucleotide sequence of human glucocerebrosidase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7289-7293.
- Sorli, S.C., Colié, S., Albinet, V., Dubrac, A., Touriol, C., Guilbaud, N., Bedia, C., Fabriàs, G., Casas, J., Ségui, B., *et al.* (2013). The nonlysosomal β -glucosidase GBA2 promotes endoplasmic reticulum stress and impairs tumorigenicity of human melanoma cells. *Faseb j* 27, 489-498.
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839-840.
- Srisuttiyakorn, C., Bulloch, K., Rodic, N., Bosenberg, M., Ariyan, S., Narayan, D., Gould Rothberg, B.E., and Galan, A. (2016). Intratumoral multinucleated giant cells are not a prognostic pathologic feature in cutaneous melanoma. *J Cutan Pathol* 43, 821-829.
- Stefanis, L., Emmanouilidou, E., Pantazopoulou, M., Kirik, D., Vekrellis, K., and Tofaris, G.K. (2019). How is alpha-synuclein cleared from the cell? *J Neurochem* 150, 577-590.
- Stirnemann, J. (2019). Personal communication (Service de Médecine Interne, Hôpitaux Universitaires de Genève, Genève, Switzerland).
- Stirnemann, J., Belmatoug, N., Camou, F., Serratrice, C., Froissart, R., Caillaud, C., Levade, T., Astudillo, L., Serratrice, J., Brassier, A., *et al.* (2017). A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. *Int J Mol Sci* 18, 441.
- Stirnemann, J., Vigan, M., Hamroun, D., Heraoui, D., Rossi-Semerano, L., Berger, M.G., Rose, C., Camou, F., de Roux-Serratrice, C., Grosbois, B., *et al.* (2012). The French Gaucher's disease registry: clinical characteristics, complications and treatment of 562 patients. *Orphanet J Rare Dis* 7, 77.
- Sultana, S., Reichbauer, J., Schüle, R., Mochel, F., Synofzik, M., and van der Spoel, A.C. (2015). Lack of enzyme activity in GBA2 mutants associated with hereditary spastic paraplegia/cerebellar ataxia (SPG46). *Biochem Biophys Res Commun* 465, 35-40.
- Sun, Y., Florer, J., Mayhew, C.N., Jia, Z., Zhao, Z., Xu, K., Ran, H., Liou, B., Zhang, W., Setchell, K.D., *et al.* (2015). Properties of neurons derived from induced pluripotent stem cells of Gaucher disease type 2 patient fibroblasts: potential role in neuropathology. *PLoS ONE* 10, e0118771.
- Sun, Y., Quinn, B., Witte, D.P., and Grabowski, G.A. (2005). Gaucher disease mouse models: point mutations at the acid beta-glucosidase locus combined with low-level prosaposin expression lead to disease variants. *J Lipid Res* 46, 2102-2113.
- Sun, Y., Zhang, W., Xu, Y.-H., Quinn, B., Dasgupta, N., Liou, B., Setchell, K.D.R., and Grabowski, G.A. (2013). Substrate compositional variation with tissue/region and Gba1 mutations in mouse models--implications for Gaucher disease. *PLoS ONE* 8, e57560.
- Sundaram, K., Mather, A.R., Marimuthu, S., Shah, P.P., Snider, A.J., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., Beverly, L.J., and Siskind, L.J. (2016). Loss of neutral ceramidase protects cells from nutrient- and energy - deprivation-induced cell death. *Biochem J* 473, 743-755.
- Sural-Fehr, T., Singh, H., Cantuti-Catelvetri, L., Zhu, H., Marshall, M.S., Rebiai, R., Jastrzebski, M.J., Givogri, M.I., Rasenick, M.M., and Bongarzone, E.R. (2019). Inhibition of the IGF-1–PI3K–Akt–mTORC2

pathway in lipid rafts increases neuronal vulnerability in a genetic lysosomal glycosphingolipidosis. *Dis Model Mech* 12, dmm036590.

Surguchov, A. (2016). Parkinson's Disease: Assay of Phosphorylated α -Synuclein in Skin Biopsy for Early Diagnosis and Association with Melanoma. *Brain Sci* 6.

Taddei, T.H., Kacena, K.A., Yang, M., Yang, R., Malhotra, A., Boxer, M., Aleck, K.A., Rennert, G., Pastores, G.M., and Mistry, P.K. (2009). The underrecognized progressive nature of N370S Gaucher disease and assessment of cancer risk in 403 patients. *Am J Hematol* 84, 208-214.

Taguchi, Y.V., Liu, J., Ruan, J., Pacheco, J., Zhang, X., Abbasi, J., Keutzer, J., Mistry, P.K., and Chandra, S.S. (2017). Glucosylsphingosine Promotes α -Synuclein Pathology in Mutant GBA-Associated Parkinson's Disease. *J Neurosci* 37, 9617-9631.

Taketomi, T., Kawamura, N., Hara, A., and Murakami, S. (1976). Comparative studies on chemical, hemolytic and diffusion-in-gel precipitation properties of various lysosphingolipids. *Biochim Biophys Acta* 424, 106-113.

Tamargo, R.J., Velayati, A., Goldin, E., and Sidransky, E. (2012). The role of saposin C in Gaucher disease. *Mol Genet Metab* 106, 257-263.

Thody, A.J., Higgins, E.M., Wakamatsu, K., Ito, S., Burchill, S.A., and Marks, J.M. (1991). Pheomelanin as well as eumelanin is present in human epidermis. *J Invest Dermatol* 97, 340-344.

Trayssac, M., Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2018). Role of sphingolipids in senescence: implication in aging and age-related diseases. *J Clin Invest* 128, 2702-2712.

van Smeden, J., Janssens, M., Gooris, G.S., and Bouwstra, J.A. (2014). The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim Biophys Acta* 1841, 295-313.

Viros, A., Sanchez-Laorden, B., Pedersen, M., Furney, S.J., Rae, J., Hogan, K., Ejima, S., Girotti, M.R., Cook, M., Dhomen, N., *et al.* (2014). Ultraviolet radiation accelerates BRAF-driven melanomagenesis by targeting TP53. *Nature* 511, 478-482.

Vitner, E.B., Farfel-Becker, T., Eilam, R., Biton, I., and Futerman, A.H. (2012). Contribution of brain inflammation to neuronal cell death in neuronopathic forms of Gaucher's disease. *Brain* 135, 1724-1735.

Vitner, E.B., Salomon, R., Farfel-Becker, T., Meshcheriakova, A., Ali, M., Klein, A.D., Platt, F.M., Cox, T.M., and Futerman, A.H. (2014). RIPK3 as a potential therapeutic target for Gaucher's disease. *Nat Med* 20, 204-208.

Volpicelli-Daley, L.A., Luk, K.C., and Lee, V.M. (2014). Addition of exogenous α -synuclein preformed fibrils to primary neuronal cultures to seed recruitment of endogenous α -synuclein to Lewy body and Lewy neurite-like aggregates. *Nat Protoc* 9, 2135-2146.

Wafaei, J.R., and Choy, F.Y. (2005). Glucocerebrosidase recombinant allele: molecular evolution of the glucocerebrosidase gene and pseudogene in primates. *Blood Cells Mol Dis* 35, 277-285.

Watanabe, H., Okahara, K., Naito-Matsui, Y., Abe, M., Go, S., Inokuchi, J., Okazaki, T., Kobayashi, T., Kozutsumi, Y., Oka, S., *et al.* (2016). Psychosine-triggered endomitosis is modulated by membrane sphingolipids through regulation of phosphoinositide 4,5-bisphosphate production at the cleavage furrow. *Molecular Biology of the Cell* 27, 2037-2050.

Wegner, M.-S., Gruber, L., Mattjus, P., Geisslinger, G., and Grösch, S. (2018). The UDP-glucose ceramide glycosyltransferase (UGCG) and the link to multidrug resistance protein 1 (MDR1). *BMC Cancer* 18, 153.

- Weinreb, N.J., Barranger, J.A., Charrow, J., Grabowski, G.A., Mankin, H.J., and Mistry, P. (2005). Guidance on the use of miglustat for treating patients with type 1 Gaucher disease. *Am J Hematol* *80*, 223-229.
- Weinreb, N.J., Charrow, J., Andersson, H.C., Kaplan, P., Kolodny, E.H., Mistry, P., Pastores, G., Rosenbloom, B.E., Scott, C.R., Wappner, R.S., *et al.* (2002). 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* *113*, 112-119.
- Weinreb, N.J., Goldblatt, J., Villalobos, J., Charrow, J., Cole, J.A., Kerstenetzky, M., vom Dahl, S., and Hollak, C. (2013). Long-term clinical outcomes in type 1 Gaucher disease following 10 years of imiglucerase treatment. *J Inher Metab Dis* *36*, 543-553.
- Weiss, K., Gonzalez, A., Lopez, G., Pedoeim, L., Groden, C., and Sidransky, E. (2015). The clinical management of Type 2 Gaucher disease. *Mol Genet Metab* *114*, 110-122.
- Weiss, M., Hettmer, S., Smith, P., and Ladisch, S. (2003). Inhibition of melanoma tumor growth by a novel inhibitor of glucosylceramide synthase. *Cancer Res* *63*, 3654-3658.
- Whiteman, D.C., Whiteman, C.A., and Green, A.C. (2001). Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Causes Control* *12*, 69-82.
- Wilkening, G., Linke, T., and Sandhoff, K. (1998). Lysosomal degradation on vesicular membrane surfaces. Enhanced glucosylceramide degradation by lysosomal anionic lipids and activators. *J Biol Chem* *273*, 30271-30278.
- Wilson, M.W., Shu, L., Hinkovska-Galcheva, V., Jin, Y., Rajeswaran, W., Abe, A., Zhao, T., Luo, R., Wang, L., Wen, B., *et al.* (2020). Optimization of Eliglustat-Based Glucosylceramide Synthase Inhibitors as Substrate Reduction Therapy for Gaucher Disease Type 3. *ACS Chem Neurosci* *11*, 3464-3473.
- Wong, K., Sidransky, E., Verma, A., Mixon, T., Sandberg, G.D., Wakefield, L.K., Morrison, A., Lwin, A., Colegial, C., Allman, J.M., *et al.* (2004). Neuropathology provides clues to the pathophysiology of Gaucher disease. *Mol Genet Metab* *82*, 192-207.
- Xu, J., Kao, S.Y., Lee, F.J., Song, W., Jin, L.W., and Yankner, B.A. (2002). Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nat Med* *8*, 600-606.
- Xu, Y.-H., Quinn, B., Witte, D., and Grabowski, G.A. (2003). Viable mouse models of acid beta-glucosidase deficiency: the defect in Gaucher disease. *The American Journal of Pathology* *163*, 2093-2101.
- Yañez, M.J., Campos, F., Marín, T., Klein, A.D., Futerman, A.H., Alvarez, A.R., and Zanlungo, S. (2021). c-Abl activates RIPK3 signaling in Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* *1867*, 166089.
- Yeung, O.W.H., Lo, C.-M., Ling, C.-C., Qi, X., Geng, W., Li, C.-X., Ng, K.T.P., Forbes, S.J., Guan, X.-Y., Poon, R.T.P., *et al.* (2015). Alternatively activated (M2) macrophages promote tumour growth and invasiveness in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* *62*, 607-616.
- Yildiz, Y., Matern, H., Thompson, B., Allegood, J.C., Warren, R.L., Ramirez, D.M., Hammer, R.E., Hamra, F.K., Matern, S., and Russell, D.W. (2006). Mutation of beta-glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility. *J Clin Invest* *116*, 2985-2994.
- Yokoyama, S., Woods, S.L., Boyle, G.M., Aoude, L.G., MacGregor, S., Zismann, V., Gartside, M., Cust, A.E., Haq, R., Harland, M., *et al.* (2011). A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature* *480*, 99-103.

Zampieri, S., Cattarossi, S., Bembi, B., and Dardis, A. (2017). GBA Analysis in Next-Generation Era: Pitfalls, Challenges, and Possible Solutions. *J Mol Diagn* 19, 733-741.

Zimran, A., Liphshitz, I., Barchana, M., Abrahamov, A., and Elstein, D. (2005). Incidence of malignancies among patients with type I Gaucher disease from a single referral clinic. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 34, 197-200.

Zimran, A., Pastores, G.M., Tytki-Szymanska, A., Hughes, D.A., Elstein, D., Mardach, R., Eng, C., Smith, L., Heisel-Kurth, M., Charrow, J., *et al.* (2013). Safety and efficacy of velaglucerase alfa in Gaucher disease type 1 patients previously treated with imiglucerase. *Am J Hematol* 88, 172-178.

Zurbrugg, M., Chan, M.Y., and Svenningsson, P. (2019). GBA RNAi but not catalytic inhibition of glucocerebrosidase with Conduritol- β -epoxide increases levels of total α -synuclein in SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 706, 217-222.

Liste des publications (entre 2017 et 2021)

Liée aux activités hospitalo-universitaires

Dubot P, Sabourdy F, Rybova J, Medin JA, Levade T. Inherited monogenic defects of ceramide metabolism: Molecular bases and diagnoses. *Clin Chim Acta*. 2019;495:457-66.

Dubot P, Liang J, Dubs J, Missiak Y, Sarazin C, Couderc F, Caussé E. Sweat chloride quantification using capillary electrophoresis. *Pract Lab Med*. 2019;13:e00114.

Dubot P, Sabourdy F, Plat G, Jubert C, Cancès C, Broué P, Touati G, Levade T. First Report of a Patient with MPS Type VII, Due to Novel Mutations in GUSB, Who Underwent Enzyme Replacement and Then Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Int J Mol Sci*. 2019;20(21).

Dubot P, Astudillo L, Touati G, Baruteau J, Broué P, Roche S, Sabourdy F, Levade T. Pregnancy outcome in Refsum disease: Affected fetuses and children born to an affected mother. *JIMD Rep*. 2019;46(1):11-5.

Smati S, Polizzi A, Fougerat A, Ellero-Simatos S, Blum Y, Lippi Y, Régnier M, Laroyenne A, Huillet M, Arif M, Zhang C, Lasserre F, Marrot A, Al Saati T, Wan J, Sommer C, Naylies C, Batut A, Lukowicz C, Fougeray T, Tramunt B, **Dubot P**, Smith L, Bertrand-Michel J, Hennuyer N, Pradere JP, Staels B, Burcelin R, Lenfant F, Arnal JF, Levade T, Gamet-Payrastra L, Lagarrigue S, Loiseau N, Lotersztajn S, Postic C, Wahli W, Bureau C, Guillaume M, Mardinoglu A, Montagner A, Gourdy P, Guillou H. Integrative study of diet-induced mouse models of NAFLD identifies PPAR α as a sexually dimorphic drug target. *Gut*. 2021.

Fougerat A, Schoiswohl G, Polizzi A, Régnier M, Wagner C, Smati S, Fougeray T, Lippi Y, Lasserre F, Melin V, Tramunt B, Alkhoury C, Emile A, Schupp M, Gourdy P, **Dubot P**, Levade T, Ellero-Simatos S, Gamet-Payrastra L, Panasyuk G, Amri E-Z, Postic C, Wahli W, Loiseau N, Montagner A, Langin D, Lass A, Guillou H. ATGL-dependent white adipose tissue lipolysis controls hepatocyte PPAR α activity. *bioRxiv*. 2021:2021.01.28.428684.

Dubot P, Rafiq M, Curot J, Simonetta-Moreau M, Sabourdy F, Pettazzoni M, Froissart R, Levade T, Ory-Magne F. A diagnosis of progressive myoclonic ataxia guided by blood biomarkers. *Parkinsonism Relat Disord*. 2021.

Dubot P, Sabourdy F, Jamme T, Verdier C, Ferrières D, Levade T, Ferrières J. Dyslipidemia: Are You Sure It Is Cholesterol? *Clinical Chemistry*. 2021;67(8):1159-61.

Review

Are Glucosylceramide-Related Sphingolipids Involved in the Increased Risk for Cancer in Gaucher Disease Patients? Review and Hypotheses

Patricia Dubot ^{1,2,†} , Leonardo Astudillo ^{1,3,†}, Nicole Therville ¹ , Frédérique Sabourdy ^{1,2}, Jérôme Stirnemann ⁴ , Thierry Levade ^{1,2,*} and Nathalie Andrieu-Abadie ^{1,*}

¹ INSERM UMR1037, CRCT (Cancer Research Center of Toulouse), and Université Paul Sabatier, 31037 Toulouse, France; patricia.dubot@inserm.fr (P.D.); rmhp.redaction@gmail.com (L.A.); nicole.therville@inserm.fr (N.T.); sabourdy.f@chu-toulouse.fr (F.S.)

² Laboratoire de Biochimie Métabolique, Centre de Référence en Maladies Héritaires du Métabolisme, Institut Fédératif de Biologie, CHU de Toulouse, 31059 Toulouse, France

³ Service de Médecine Interne, CHU de Toulouse, 31059 Toulouse, France

⁴ Service de Médecine Interne Générale, Hôpitaux Universitaires de Genève, CH-1211 Genève, Switzerland; jerome.stirnemann@hcuge.ch

* Correspondence: thierry.levade@inserm.fr (T.L.); nathalie.andrieu@inserm.fr (N.A.-A.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 28 November 2019; Accepted: 14 February 2020; Published: 18 February 2020



Abstract: The roles of ceramide and its catabolites, i.e., sphingosine and sphingosine 1-phosphate, in the development of malignancies and the response to anticancer regimens have been extensively described. Moreover, an abundant literature points to the effects of glucosylceramide synthase, the mammalian enzyme that converts ceramide to β -glucosylceramide, in protecting tumor cells from chemotherapy. Much less is known about the contribution of β -glucosylceramide and its breakdown products in cancer progression. In this chapter, we first review published and personal clinical observations that report on the increased risk of developing cancers in patients affected with Gaucher disease, an inborn disorder characterized by defective lysosomal degradation of β -glucosylceramide. The previously described mechanistic links between lysosomal β -glucosylceramidase, β -glucosylceramide and/or β -glucosylsphingosine, and various hallmarks of cancer are reviewed. We further show that melanoma tumor growth is facilitated in a Gaucher disease mouse model. Finally, the potential roles of the β -glucosylceramidase protein and its lipidic substrates and/or downstream products are discussed.

Keywords: glucocerebrosidase; sphingosine; ceramide; myeloma; melanoma; acid ceramidase; glucosylsphingosine

1. Introduction: Glucosylceramide and Gaucher Disease

In the last three decades, much attention has been paid to the functions of sphingolipids in cancer cell biology, with a major focus on the roles played by ceramide and sphingosine 1-phosphate (such an interest in this field is exemplified by the present Special Issues) [1–3]. Besides these simple sphingolipids, glycolipids are also involved in multiple facets of cancer development. For instance, as components of membrane microdomains, gangliosides, such as GM3, GD3 or GD2, have been extensively described as regulators of tyrosine kinase receptors with subsequent effects on tumor cell proliferation, migration and survival (for recent reviews, see [4,5]). More recently, the implication of several complex glycosphingolipids in the epithelial-to-mesenchymal transition process has also been documented (see, for instance, [6–8]). Of note, in addition to their roles in oncogenic signaling, some

complex glycolipids can be used as prognostic markers in cancer disease progression. Furthermore, clinical trials with some monoclonal antibodies against specific tumor-associated complex glycolipids (e.g., anti-GD2) have shown improved outcomes in patients with solid cancers such as neuroblastoma [9].

In mammals, the vast majority of glycolipids are formed from β -glucosylceramide (GlcCer). How this lipid modulates cancer development still remains to be fully elucidated. In the late nineties, a pioneering work by Cabot and co-workers revealed the importance of the enzyme GlcCer synthase in promoting the resistance of breast cancer cells to various anticancer agents [10,11]. Since then, numerous studies have explored the role of ceramide glucosylation in multidrug resistance (for reviews, see [12,13]). However, how GlcCer catabolism may influence the behavior of cancer cells or tumor cell microenvironment has received little attention. Here, we review the knowledge in this field and discuss various hypotheses.

GlcCer is synthesized from ceramide by a single enzyme, GlcCer synthase, encoded in humans by the *UGCG* gene. At remarkable variance with other sphingolipid synthesis enzymes, GlcCer synthase faces the cytosolic surface of the Golgi apparatus. Using UDP-glucose as a sugar donor, this enzyme adds a β -glucose to ceramide (or N-acylsphingosine; see chemical structure in Figure 1). Once GlcCer is formed, it translocates to the luminal leaflet of Golgi saccules to be further glycosylated and give rise to numerous glycolipids, which are then transported to the plasma membrane.

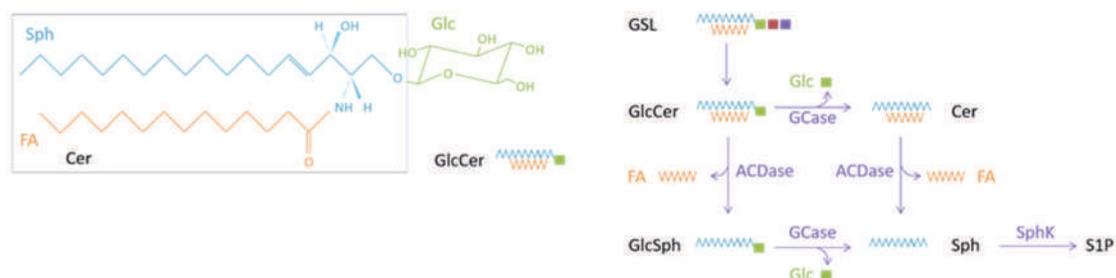


Figure 1. Glucosylceramide structure and metabolism. Abbreviations: Cer, ceramide; FA, fatty acid; Glc, glucose; GSL, glycosphingolipid; Sph, sphingosine; S1P, sphingosine 1-phosphate; SphK, sphingosine kinase. Fatty acids found in GlcCer usually include C16:0, C18:0, C22:0 and C24:1.

Enzymatic breakdown of GlcCer in mammalian cells seems to be mediated by at least three β -glucosidases which cleave off the β -glucosidic linkage (see [14]). The best-known GlcCer-degrading enzyme is the acid β -glucosylceramidase (or glucocerebrosidase; GCase), a lysosomal hydrolase encoded by the *GBA1* gene. In the presence of saposin C, the GCase protein catalyzes the degradation of endolysosomal GlcCer, which itself originates from the stepwise degradation of endocytosed glycosphingolipids in the acidic compartments of the cell. The released ceramide then becomes the substrate of the last enzyme of lysosomal sphingolipid catabolism, acid ceramidase (ACDase), which liberates a fatty acid and sphingosine (see Figure 1). In humans and mice, GCase has more recently been shown to catalyze also the transfer of a sterol molecule to β -glucose, thereby forming 1-O-sterol glucoside, as well as some transglucosylation reactions with alcohols [15,16]. While cholesteryl glucoside is a naturally occurring compound, the other transglucosylation products are not.

Gaucher disease (GD) is the most prevalent lysosomal storage disorder involving sphingolipid metabolism; its prevalence is higher in the Ashkenazi Jewish population. It is an autosomal recessive disease, generally caused by pathogenic mutations in the *GBA1* gene (quite exceptionally, it arises from mutations in the *PSAP* gene encoding saposins). By causing the loss of, or a marked reduction in, the catalytic activity of GCase, these mutations are responsible for the lysosomal accumulation of undegraded GlcCer. Importantly, the lysosphingolipid molecule β -glucosylsphingosine (GlcSph) also accumulates [17], likely due to the cleavage of excess GlcCer by lysosomal ACDase [18,19]. The lipid storage mostly affects monocytic-macrophage cells (the so-called Gaucher cells) in the spleen, liver and bone marrow, but can also involve cells of the central nervous system in the most severe, neuronopathic form of the disease. The age of disease onset is extremely variable. The most common

subtype of GD is the so-called type 1, with no neurologic involvement. Symptoms of this form of GD include splenomegaly and hepatomegaly, possibly leading to anemia and thrombocytopenia, and bone involvement (osteopenia, fractures, aseptic necrosis and infarcts). Life expectancy in type 1 GD can be normal. Specific treatment of GD is currently based on enzyme replacement therapy, which consists of intravenous infusions of recombinant human GCase every two weeks, or substrate reduction therapy through the oral administration of an inhibitor of GlcCer synthase [20–22].

2. An increased Risk of Cancer in Patients with Gaucher Disease

In the last thirty years, the association between GD and cancer has been repeatedly described. Indeed, several case studies and small case-series reported on the occurrence of hematologic malignancies in GD, including B-cell or plasma cell malignancy, such as multiple myeloma (MM), acute or chronic leukemia and Hodgkin's disease [23–28]. A causal link between GlcCer storage and occurrence of cancers was already suggested in 1982 by Lee, who found tumors in some of the 239 GD patients examined [29]. In a group of 23 patients, 43% had a diffuse hypergammaglobulinemia and 8% had a monoclonal gammopathy [30]. In a cohort of 63 adult GD patients, a polyclonal gammopathy and monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) were observed in 41% and 19% of patients, respectively [31]. MGUS is a pre-malignant condition that predisposes to MM with a 1% risk of transformation per year in the general population [32]. A beneficial effect of enzyme replacement therapy on the development of gammopathies in GD patients has been suggested [31]. Several additional cohorts of GD patients, mostly with type 1 Gaucher, have been studied to further explore the risk of malignancies in such populations; results are summarized in Table 1. Differences between these cohorts include the origin (ethnicity or ancestry) and age of GD patients, and the proportion under enzyme replacement therapy. These possibly explain differences in the overall risk for developing cancers and for the type of malignancies diagnosed. As a matter of fact, the proportion of GD patients with cancer differs from one cohort to another, and the overall relative risk for cancers in GD patients can vary from 0.79 to 3.6. The highest relative risks for a specific type of cancer were reported for hepatocellular carcinoma (up to 141.3), MM (up to 51.1) and hematologic cancers (up to 14.7; [33]) (the reader is also referred to a recent systematic review on this topic [34]). In some studies, such as that published by Zimran and co-workers, 4% of GD patients developed cancers (mainly lymphoma, myelodysplastic syndrome and MM) but there was no statistical difference when comparing with Israeli national registers [35]. Of note, Rosenbloom and co-workers calculated a relative risk of 5.9 for developing MM, but there was no increase in other cancers as compared to the expected incidence in the US population; however, most of the GD patients (85%) studied were under 55 years of age, possibly leading to an underestimation of cancer cases [36]. A very high risk for developing hematologic malignancies, including MM, was also observed in a Western Europe cohort of GD patients [37]. This study also pointed the high prevalence of MGUS (up to 16% in the Dutch GD patients) and underlined the absence of differences in GD activity, spleen status or *GBA1* genotype in patients with or without cancer. Besides hematologic malignancies (non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's disease, acute myeloid leukemia, acute leukemia lymphoid, myelodysplastic syndrome), numerous types of solid tumors have been described in GD patients (see for instance [34,37–39]). Interestingly (see Section 4), GD patients display an increased risk of melanoma (relative risk from 2.26 to 3.07) [38,40].

Table 1. Susceptibility of patients affected with Gaucher disease to develop malignancies.

Type of Population	Number of Patients	Age of Patients (Years)	Incidence and Type of Cancer, and Relative Risk for the Indicated Malignancy (in Brackets, 95% CI)	Overall Relative Risk for Cancer (in Brackets, 95% CI)	Reference
Ashkenazi Jewish (Israel)	48	54 ± 20	Patients with any cancer: 20.8% Mean age at cancer diagnosis: 57 ± 18 RR for hematologic cancers: 14.7 [5.2–41.7]	3.6 [1.7–7.5]	Shiran et al. 1993 [33]
Caucasian, non-Jewish (22.7%) Ashkenazi Jewish (23.2%) Unreported (39.8%)	2742	0–14: 25.6% 15–44: 47% 45–54: 12.2% 55–64: 7.5% >65: 7.7%	Patients with any cancer: 4.6% (9.1% in Ashkenazi Jewish) RR for myeloma: 5.9 [2.8–10.8] RR for hematologic cancers: 1.23 [0.73–1.90]	0.79 [0.67–0.94]	Rosenbloom et al. 2005 [36]
Ashkenazi Jewish	505	Males: 38.7 ± 21 Females: 37 ± 21	Patients with any cancer: 4.0%	Males: 0.6 [0.12–1.1] Females: 1.4 [0.7–2.2]	Zimran et al. 2005 [35]
Mostly non-Ashkenazi Jewish (Netherlands and Germany)	131	50 ± 14	Patients with any cancer: 10.7% Median age at cancer diagnosis: 52 RR for hematologic cancers: 12.7 [2.6–37.0] RR for myeloma: 51.1 [6.2–184] RR for liver carcinoma: 141.3 [17.1–510.5]	2.5 [1.1–4.7]	de Fost et al. 2006 [37]
US male veterans (African Americans: 11.7%)	1525	African Americans: 46.0 Whites: 49.7	Patients with any cancer: 9% RR for non-Hodgkin lymphoma: 2.54 [1.32–4.88] RR for melanoma: 3.07 [1.28–7.38] RR for pancreatic cancer: 2.37 [1.13–4.98]	0.91 [0.76–1.08]	Landgren et al. 2007 [40]
Mostly Ashkenazi Jewish	403	44 (for homozygous N370S patients)	Patients with any cancer: 12.5% RR for myeloma: 25 [9.17–54.4] RR for other hematologic cancers: 3.45 [1.49–6.79] RR for breast cancer: 1.84 [0.84–3.49] RR for melanoma: 2.26 [0.62–5.79]	1.80 [1.32–2.40]	Taddei et al. 2009 [38]
Mostly Jewish (Israel)	500	0–17: 9.4% 18–24: 4.4% 25–34: 11.4% 35–44: 20.6% 45–54: 12.4% 55–64: 16.0% 65–74: 14.6% >75: 11.2%	Patients with any cancer: 22.2% Patients with myeloma: 1%	ND	Jaffe et al. 2019 [41]
Caucasian (France)	658	50.8	Patients with any cancer: 4.1% Patients with hematologic cancers: 1.5%	ND	Stirmemann (unpublished) [42]

Abbreviations: CI, confidence intervals; ND, not described; RR, relative risk.

Very recently, Jaffe and co-workers reported that 22% of GD patients from a cohort of 500 Israeli GD patients (quite representative of the Israeli population) had a history of cancer [41]. Patients who received enzyme replacement therapy did not significantly differ from those without this treatment. In this cohort, MM was noted only in five patients (1%).

Among the 658 GD patients of the French GD registry [43], 27 patients with type 1 GD had at least one malignancy: 22 solid tumors and 10 hematologic cancers were observed [42] (Tables S1 and S2). In this group of patients with cancer, 59% received enzyme replacement therapy, again suggesting that the correction of the enzyme deficiency did not reduce the risk of cancer. Moreover, five patients had an additional cancer. The occurrence of multiple cancers in GD has already been reported [38,40,44], some cancers having arisen after splenectomy and/or under enzyme replacement therapy. This observation may strengthen the idea that GD is a predisposing condition for cancer.

3. What Could Be the Relationship between Glucosylceramide, Gaucher Disease and Cancer?

GD is commonly associated with chronic cell and tissue inflammation, as well as immune system dysregulation: two factors that could easily be incriminated in the promotion of cancer development. Indeed, analysis of the plasma of patients suffering from GD has revealed increased levels of many pro- and anti-inflammatory cytokines, including IL-1 β , TNF α , IL-10 and IL-6 [45–48], which regulate B-cell proliferation. Interestingly, IL-6 has also been reported to be elevated in GD patients with clonal immunoglobulin abnormalities [45,46]. With regard to the pathogenesis of GD, p38 mitogen-activated protein kinases are believed to act as pro-inflammatory kinases that mediate the production of IL-6 and TNF α [49]. Moreover, administration of the pharmacological chaperone isofagomine to neuronopathic GD mice, which can stimulate mutant GCase function, inhibited p38 activation and TNF α production in brain tissues, and extended animal life span [50]. Which p38 isoforms are predominantly activated in GD patients remains to be determined, although all of them were detected in GD mouse brain [49]. Of particular interest is the observation that ceramide, which is produced by GCase in the PKC δ -dependent salvage pathway [51], down-regulated the activation of the p38 δ isoform through ceramide-activated protein phosphatases [52]. Importantly, GBA1 silencing induced p38 δ and promoted IL-6 production after phorbol ester treatment [53]. In contrast, increasing the cellular content of ceramide by adding cell-permeable ceramide analogs could reduce IL-6 levels [53]. The altered cytokine profile observed in GD patients may, therefore, be the consequence of abnormal sphingolipid turnover and constitute a favorable environment to promote tumorigenesis.

As far as we know, the pathophysiology of GD is linked to the defective GCase enzymatic activity. Indeed, restoring enzyme activity by exogenous supply of a recombinant active GCase (i.e., enzyme replacement therapy) to the patient corrects most of the non-neurological symptoms (whether the parkinsonism associated with GD or heterozygosity for *GBA1* mutations is solely due to reduced GCase activity or, alternatively, implicates a misfolded GCase protein prone to aggregation, is still a matter of debate). Insufficient GCase activity results in increased levels of undegraded GlcCer and its deacylated form GlcSph in cells, in particular macrophages, known as Gaucher cells, as well as in plasma. Thus, the hypothesis that the glycolipid accumulation in Gaucher cells affects their immune phenotype, leading to alternatively activated (M2) macrophages, was postulated. Quite unexpectedly, the pro-inflammatory cytokine profile does not seem to be the product of Gaucher cells, which instead display anti-inflammatory characteristics with the expression of CD163 and IL1-Ra [45]. However, macrophages surrounding Gaucher cells (for instance, in spleen) would be the source of the pro-inflammatory environment [45]. Additionally, atypical Gaucher cells have been described, which express some markers of tumor-associated macrophages such as CD63, CD168 and VEGF [54], and could participate in tumor development, as already described in hepatocellular carcinoma [55]. Gaucher cells would also produce chemokines leading to an immune cell infiltration (with macrophages, dendritic cells, neutrophils and lymphocytes) in organs, as observed in GD mouse models [56–58]. In addition, subcutaneous administration of GlcSph in C57BL/6J mice resulted in a splenomegaly characterized by an infiltration of M2 macrophages and a slight elevation in circulating

TNF α and IL-1 β [59]. Of note, GlcCer has been reported as a specific ligand for macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) of antigen-presenting cells, leading to the production of TNF α and MIP-2, as well as the up-regulation of costimulatory molecules presentation [60]. Moreover, the liver of GD mice, treated either by enzyme replacement alone or by substrate reduction therapy (to attenuate sphingolipid storage), showed a decreased macrophage infiltration, suggesting a potential role of GlcCer and GlcSph in controlling the macrophage burden [61].

In GD patients, T-cell-independent activation of B-cells has been reported, which may result from the activation of GlcCer- and GlcSph-specific type II NKT cells constitutively expressing T-follicular helper (T_{FH}) phenotype [62]. The clonal immunoglobulins, found in the plasma of GD patients and mice, have been shown to react against GlcSph and GlcCer [63,64]. Interestingly, anti-GlcSph antibodies were reduced in mice treated by eliglustat tartrate (i.e., by substrate reduction therapy) as compared to untreated mice [64]. Moreover, anti-GlcCer IgG autoantibodies and GlcCer could form immune complexes, which activate the complement. While the activation of complement C5a and C5a receptor 1 helped to stimulate pro-inflammatory cytokine production and potentiate the innate and adaptive immune response, it also led to the accumulation of GlcCer by up-regulating the GlcCer synthase [65]. Remarkably, a mouse model of GD with prolonged survival exhibited signs of B-cell hyperproliferation, including lymphadenopathy and plasmacytosis, despite minimal storage of GlcCer [66]. Another strain of mice with an inducible deficiency of GCCase in hematopoietic cells, which were characterized by high levels of GlcCer and GlcSph in plasma, liver and spleen, have been reported to develop B-cell lymphoid malignancies. This event was associated with a dysregulation of humoral immunity along with the secretion of clonal immunoglobulins [67]. In this mouse model of non-neuronopathic GD, Gaucher cells were found to infiltrate the splenic T-cell zone and be surrounded by plasma cells. In a similar inducible mouse model of type 1 GD, thymic T development was impaired with a B-cell activation and a recruitment of macrophages and dendritic cells in secondary lymphoid organs [68,69]. The vicinity of Gaucher cells and plasma cells suggests that GlcCer and GlcSph, produced by Gaucher cells, could influence plasma cells. Indeed, when the GD mice were treated early by eliglustat tartrate, leading to a reduced accumulation of these glycolipids, tumor development was prevented; it was only slowed down when treatment was established after tumor development [70]. Hence, through their potential role in regulating chronic antigenic inflammation, immune activation and signaling mechanisms that control cell fate, GlcCer and GlcSph appear to be bona fide candidates for participating in GD predisposition to cancer.

Another hypothetical link between GD and cancer is autophagy, which is critical for cell survival in response to pathologic stresses. GCCase has been reported to behave as a positive mediator of autophagic cell death. Indeed, *GBA1* knockdown in A549 lung cancer cells treated with resveratrol, which led to increased intracellular ceramide levels, prevented the abnormal ultrastructural changes characteristic of autophagic cell death [71]. However, defective autophagy has been reported in models of GCCase or saposin C deficiency [72–74]. Of note, impaired autophagy could be involved in the systemic inflammation discussed above via a constant inflammasome activation in human Gaucher macrophages [75]. An accumulation of GlcCer was also associated to autophagy dysfunction in a drosophila model of GD that lacked the two fly *GBA1* orthologs [76]. In this model, an increase in the autophagolysosomal protein Atg8/LC3 and the ubiquitinated proteins p62 in the fly's brain was described, leading to age-dependent locomotor deficits and a reduced lifespan. Similarly, autophagy impairment, with an accumulation of autophagosomes and a defect in autophagosome-lysosome fusion, was observed in induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from patients with GD, which exhibit reduced GCCase activity and GlcCer accumulation [77].

Interestingly, the inhibition of GCCase by conduritol B epoxide was also shown to lead to hyperactivation of the key autophagy inhibitor mTOR and the reduction in levels of the transcription factor EB (TFEB) in a human neuroglioma cell line [78]. TFEB, a master regulator of lysosome function [79], is downregulated by mTORC1 [80] and modulates the expression of genes involved in different steps of the autophagy process [81]. TFEB overexpression alone did not reverse the autophagy

defect in iPSCs derived from GD patients, but was effective in the presence of recombinant GCCase, suggesting a potential role of GCCase on TFEB stability [82]. Altogether, these observations suggest that GCCase loss-of-function critically affects functional autophagy. In addition, the pharmacological inhibition of GlcCer synthase led to reduced mTORC1 activation [78], indicating that the lipid GlcCer also regulates autophagy.

While autophagy is often associated with tumor progression, a number of studies have shown that impaired autophagy can favor cancer development [83,84]. First, defective autophagy supports tumorigenesis through mitochondrial dysfunction and the production of mutagenic reactive oxygen species [85,86]. Second, ERK-induced TFEB phosphorylation leads to its inactivation and impairs expression of autophagy-lysosome target genes in BRAF-mutant melanoma [87]. This phenomenon was shown to promote a TGF- β -dependent epithelial-to-mesenchymal transition, metastasis formation and chemoresistance [87]. Third, activation of the mTOR pathway, which participates in protein synthesis and cell proliferation [88], has often been associated with the development of tumors, including melanoma, where it has been correlated with a poor prognosis [89]. Whether disturbed autophagy is causally related to cancer development in GD patients is still unknown, and how GCCase affects this process still remains unclear.

A further possible connection between GCCase, GD and cancer implicates protein misfolding. It is now established that carriers of *GBA1* mutations have a predisposition to develop Parkinson disease (PD) (see [90–92] for reviews). PD is a neurodegenerative disease, associated with the aggregation of misfolded α -synuclein. Intriguingly, PD patients have a higher risk of developing cancer [93], and in particular melanoma [94]. As a matter of fact, melanoma growth was increased in PD mice compared to wild-type mice [95,96]. Several hypotheses have been proposed to explain this finding. A first hypothesis involves the accumulation/aggregation of α -synuclein. Indeed, its expression is higher in the skin of patients with melanoma compared to that of healthy subjects. α -Synuclein could contribute to cancer development by inhibiting autophagy [97]. Its aggregation would result from GCCase loss-of-function and, consequently, GlcCer and/or GlcSph accumulation, as shown in PD neuronal cells [98] and in GD/PD mouse models [99]. However, this aggregation may also result from a gain-of-function effect of mutant GCCase [90], which could impair the degradation of α -synuclein [100] and other misfolded proteins. These events could be due to disturbances in autophagy and proteasomal degradation [101,102]. A second hypothesis implicates parkin, an ubiquitin E3 ligase involved in the proteasome-dependent degradation of misfolded proteins, and for which loss-of-function mutations underlie familial PD [93]. Parkin is also considered as a tumor suppressor and its loss of function would promote cell proliferation by increasing cyclin E [93]. In GD, endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) of misfolded mutant GCCase has been observed [103]. Mutant GCCase could interact directly with parkin in an unnatural manner [104], resulting in the accumulation of its natural substrates [105] and impaired parkin functions. Finally, the accumulation of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum activates the unfolded protein response (UPR), which could participate in cancer development [106]. For example, IL-4 synergizes with IL-6 and IL-10 to promote cathepsin secretion in tumor-associated macrophages via UPR activation, resulting in cancer cell invasion [107]. Moreover, in a GD fly model, in which (neuro)inflammation was initially observed, treatment with a GCCase chaperone could reverse the phenotype, suggesting a role for GCCase in inflammation [108]. Thus, the possibility that mutated GCCase by itself could promote cancer by impairing protein degradation systems cannot be ruled out.

4. Increased Melanoma Growth in Gaucher Disease

Based on the above literature, emphasizing the increased risk for GD patients to develop cancer, we wished to experimentally assess such a risk in an animal model recapitulating the main features of type 1 GD. In this experimental approach, a skin melanoma model was studied, as the prevalence of this type of cancer has been shown to be more frequent in GD patients (see Table 1). To this end, compound heterozygous *Gba1*^{D409V/null} mice and age-matched wild-type littermates were challenged with a

subcutaneous injection of the B16F10 mouse melanoma cell line (i.e., a cell line derived from animals with the C57BL/6 background). These compound heterozygous GD mice, which were previously obtained by crossing *Gba1*^{D409V/D409V} mice with *Gba1*^{wt/null} mice, exhibited 3% ± 2% and 5% ± 1% residual GCase activity in liver (Figure 2A) and spleen (Figure 2B), respectively, compared to wild-type mice. These mice have been shown to accumulate GlcCer in liver and spleen [56,109], pointing to the association of the observed deficient GCase activity, and the storage of GlcCer as well as GlcSph, as reported in patients with GD [110,111].

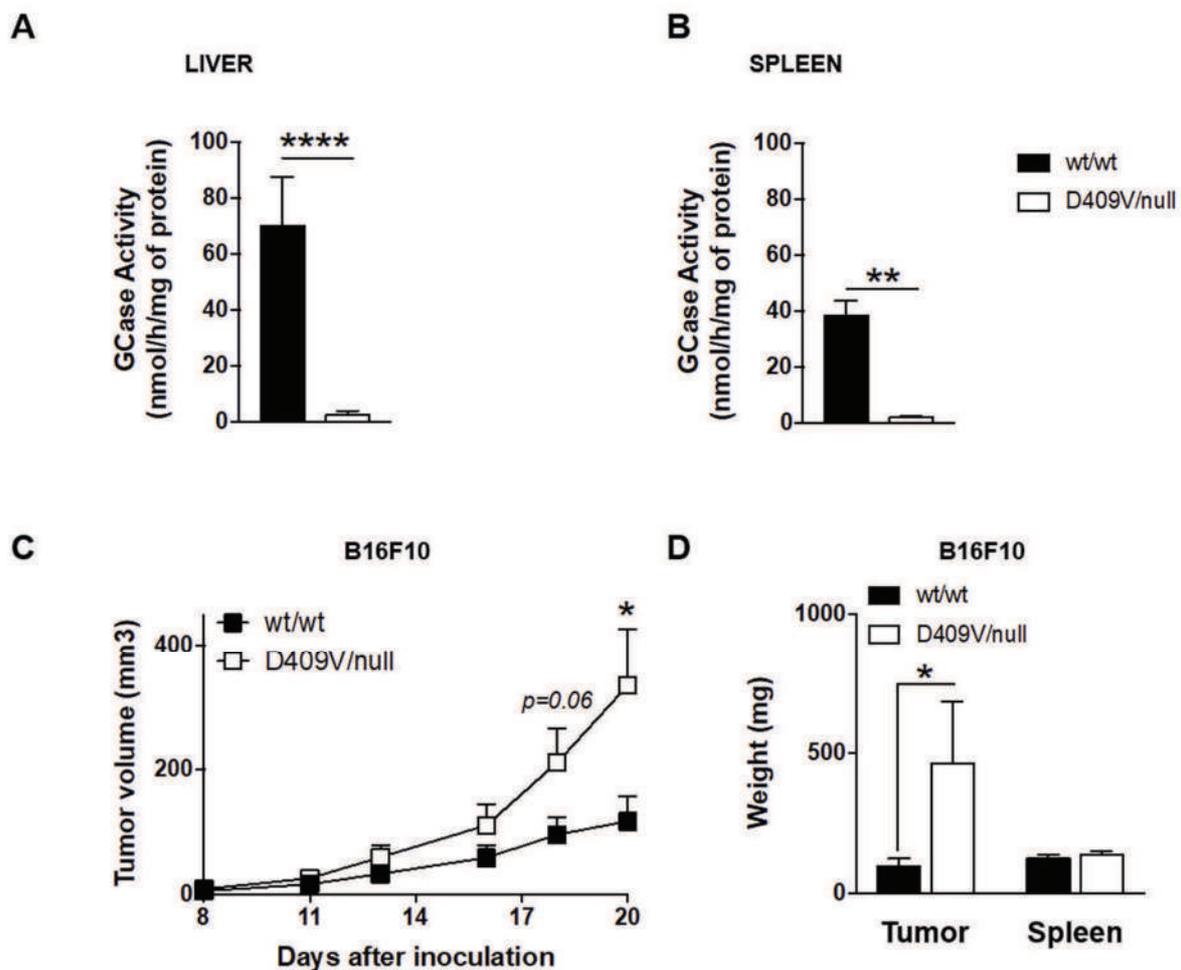


Figure 2. Melanoma tumor growth is increased in *Gba1*^{D409V/null} mice. (A,B) GCase enzyme activity was assessed in lysates of liver (A) and spleen (B) isolated from D409V/null mice (D409V/null) or homozygous wild-type littermates (*wt/wt*) having the same mixed genetic background. Assays were performed in duplicate on samples of three to six animals (18–22 weeks of age). (C,D) 3×10^5 B16F10 melanoma cells were injected subcutaneously into *wt/wt* or D409V/null mice (19–22 weeks of age). Tumor volumes were measured every 3 days (C). Tumor and spleen weights were measured 25 days after tumor inoculation. Data are expressed as means ± SEM of at least two independent experiments ($n = 7–21$ mice). Statistical differences were determined using the Mann–Whitney test. Asterisks indicate statistically significant differences: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$.

Analysis of tumor volume (Figure 2C) and tumor weight (Figure 2D) showed that the B16F10 cells grew much faster in *Gba1*^{D409V/null} mice than in wild-type animals bearing the same tumors. In contrast, spleen weight remained unchanged (Figure 2D). Similar observations were made using a distinct GD mouse model, the homozygous *Gba1*^{D409V/D409V}, known to accumulate both GlcCer and GlcSph [112], and using a distinct melanoma cell line, B16BL6 [113].

Altogether, these data suggest that the sphingolipid storage in host tissues, which is associated with homozygosity or compound heterozygosity for disease-causing mutations in the *Gba1* gene, could favor melanoma tumor growth in mice. While no significant simple changes in the tumor-infiltrating lymphoid cells have yet been detected in our GD/melanoma model [113], further investigations are necessary, especially in order to carefully characterize the serum cytokines and chemokines as well as the type of immune cells in blood and in tumors. As previously alluded to, the GD mice we used are known to exhibit systemic inflammation with a complex pattern of infiltration of immune cells in organs, including both IFN γ -regulated pro-inflammatory and IL-4-regulated anti-inflammatory networks, which can be reversed by enzyme replacement therapy [57,58,61,65,114]. In addition, the systemic elevation of some cytokines, such as TNF α , IL-6, IL-8, and IL-10, observed in GD patients [46,48,115], which are known to promote tumor development, could be involved in the increased tumor growth we observed.

5. Concluding Remarks and Outlook

Accumulating evidence, based on both clinical observations on large patient populations and animal and in vitro studies, highlights the link between GD and cancer. The involvement of undegraded substrates, i.e., GlcCer and GlcSph, and the subsequent alterations in the inflammatory and immune responses seem to be the most legitimate underlying hypotheses. The resulting changes in the tumor environment may well contribute to tumor development. However, how the GCCase lipid substrates finely modulate signaling pathways and promote cancer development still remains unclear. It has been postulated that, following its formation by ACDase, GlcSph could exit the lysosomal compartment and be degraded by the non-lysosomal β -glucosidase GBA2, thereby releasing sphingosine, which could then be phosphorylated to produce sphingosine 1-phosphate (see Figure 1). The latter lysolipid is well known for its oncogenic properties, such as tumor progression, inflammation, and immune cell trafficking [3,116]. Supporting this tenet, Mistry and co-workers generated a deletion of *Gba2* in their GD mouse model, which led to some rescue of the phenotype, suggesting a role for these sphingolipid products. However, the Th1 and Th2 cytokine profiles were not completely restored, indicating that GlcCer and GlcSph, which remained elevated, play an intrinsic role [117]. Additional GlcCer- and GlcSph-derived sphingolipids could be implicated in the increased risk for lymphoproliferative disorders and cancers that are associated with GD. For instance, GM3 levels are increased in GD [17]. This ganglioside, present in many tumor types, is generally viewed as an inhibitory or suppressive agent in cancer development and progression [4]. Whether it interferes with cancer cell development in GD is entirely unknown.

An important question arises as to whether current strategies used to treat GD can influence the development and onset of associated malignancies. At this stage, GD patients under enzyme replacement therapy analyzed in several cohorts (see Table 1 and Tables S1 and S2) do not seem to have a lower risk of developing cancer. It is still difficult to exclude the possibility that therapies used for GD may have not been long enough to fully correct all the abnormalities leading to cancer. In addition, which GD biomarker is associated with any possible accompanying cancer is unknown. Future studies on GD patients receiving disease-specific treatment (either enzyme replacement therapy or substrate reduction therapy) should carefully monitor relevant biological markers such as plasma sphingolipids, i.e., GlcCer, GlcSph, and ideally sphingosine and sphingosine 1-phosphate, as well as cytokines/chemokines, to assess any potential correlation between these biomarkers and the occurrence of malignancies. Elucidation of the potential roles of GlcCer-related sphingolipids in driving the increased risk of cancer in GD patients is of utmost importance to define novel therapeutic strategies. For instance, should GlcSph be causally involved, as postulated for GD-associated gammopathies and multiple myeloma [64], ACDase inhibitors may prove to be valuable. In a similar way, should the non-lysosomal GBA2 and sphingosine 1-phosphate be implicated, enzyme inhibitors of GBA2 and/or sphingosine kinases may be attractive strategies for the prevention of cancers in GD patients. The relevance of such combinations is supported by the observation that the deletion of *Gba2* ameliorates

the phenotype of GD type 1 mice [117]. The assessment and possible validation of these hypotheses undoubtedly needs the development of appropriate animal models.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/2/475/s1>, Table S1: Characteristics of cancer patients in the French Registry of Gaucher Disease (total: 658 GD patients), Table S2: Characteristics of cancers in the French Registry of Gaucher disease.

Author Contributions: Conceptualization, L.A. and T.L.; Methodology, P.D., L.A., N.T. and J.S.; Formal Analysis, P.D., L.A., J.S., T.L. and N.A.-A.; Writing—Original Draft Preparation, P.D., L.A., F.S., T.L. and N.A.-A.; Writing—Review and Editing, T.L. and N.A.; Supervision, T.L. and N.A.; Funding Acquisition, L.A. and T.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from INSERM, Université Paul Sabatier, Vaincre les Maladies Lysosomales, and the Shire Company (to LA).

Acknowledgments: The authors wish to thank Gregory A. Grabowski and Ying Sun (Children’s Hospital Medical Center, Cincinnati, OH) for providing the Gaucher mouse models, Céline Colacios (INSERM 1037, CRCT, Toulouse, France) for flow cytometry analysis, Bruno Ségui for critical reading, and James McDonagh for editing.

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

Abbreviations: ACDase: acid ceramidase; GCase, glucosylceramidase; GD, Gaucher disease; GlcCer, β -glucosylceramide; GlcSph, β -glucosylsphingosine; iPSCs, induced pluripotent stem cells; MGUS, monoclonal gammopathy of undetermined significance; MM, multiple myeloma; PD, Parkinson disease; TFEB, transcription factor EB; UPR, unfolded protein response.

References

- Ogretmen, B.; Hannun, Y.A. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 604–616. [[CrossRef](#)]
- Ogretmen, B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 33–50. [[CrossRef](#)]
- Hait, N.C.; Maiti, A. The Role of Sphingosine-1-Phosphate and Ceramide-1-Phosphate in Inflammation and Cancer. *Mediat. Inflamm.* **2017**, *2017*, 4806541. [[CrossRef](#)]
- Hakomori, S.-I.; Handa, K. GM3 and cancer. *Glycoconj. J.* **2015**, *32*, 1–8. [[CrossRef](#)]
- Groux-Degroote, S.; Rodríguez-Walker, M.; Dewald, J.H.; Daniotti, J.L.; Delannoy, P. Gangliosides in Cancer Cell Signaling. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2018**, *156*, 197–227.
- Hakomori, S. Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: Recollections and future trends. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1780*, 325–346. [[CrossRef](#)]
- Jacob, F.; Alam, S.; Konantz, M.; Liang, C.-Y.; Kohler, R.S.; Everest-Dass, A.V.; Huang, Y.-L.; Rimmer, N.; Fedier, A.; Schöttau, A.; et al. Transition of Mesenchymal and Epithelial Cancer Cells Depends on α 1-4 Galactosyltransferase-Mediated Glycosphingolipids. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 2952–2965. [[CrossRef](#)]
- Levade, T.; Andrieu-Abadie, N.; Micheau, O.; Legembre, P.; Ségui, B. Sphingolipids modulate the epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Cell Death Discov.* **2015**, *1*, 15001. [[CrossRef](#)]
- Yu, A.L.; Gilman, A.L.; Ozkaynak, M.F.; London, W.B.; Kreissman, S.G.; Chen, H.X.; Smith, M.; Anderson, B.; Villablanca, J.G.; Matthay, K.K.; et al. Anti-GD2 Antibody with GM-CSF, Interleukin-2, and Isotretinoin for Neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 1324–1334. [[CrossRef](#)]
- Lavie, Y.; Cao, H.; Bursten, S.L.; Giuliano, A.E.; Cabot, M.C. Accumulation of glucosylceramides in multidrug-resistant cancer cells. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 19530–19536. [[CrossRef](#)]
- Lavie, Y.; Cao, H.T.; Volner, A.; Lucci, A.; Han, T.Y.; Geffen, V.; Giuliano, A.E.; Cabot, M.C. Agents that reverse multidrug resistance, tamoxifen, verapamil, and cyclosporin A, block glycosphingolipid metabolism by inhibiting ceramide glycosylation in human cancer cells. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 1682–1687. [[CrossRef](#)]
- Morad, S.A.F.; Cabot, M.C. The Onus of Sphingolipid Enzymes in Cancer Drug Resistance. *Adv. Cancer Res.* **2018**, *140*, 235–263.
- Wegner, M.-S.; Gruber, L.; Mattjus, P.; Geisslinger, G.; Grösch, S. The UDP-glucose ceramide glycosyltransferase (UGCG) and the link to multidrug resistance protein 1 (MDR1). *BMC Cancer* **2018**, *18*, 153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Astudillo, L.; Therville, N.; Colacios, C.; Ségui, B.; Andrieu-Abadie, N.; Levade, T. Glucosylceramidases and malignancies in mammals. *Biochimie* **2016**, *125*, 267–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Akiyama, H.; Kobayashi, S.; Hirabayashi, Y.; Murakami-Murofushi, K. Cholesterol glucosylation is catalyzed by transglucosylation reaction of β -glucosidase 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *441*, 838–843. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Vanderjagt, D.J.; Fry, D.E.; Glew, R.H. Human glucocerebrosidase catalyses transglucosylation between glucocerebroside and retinol. *Biochem. J.* **1994**, *300*, 309–315. [[CrossRef](#)]
17. Nilsson, O.; Mansson, J.-E.; 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**, *712*, 453–463. [[CrossRef](#)]
18. Flanagan, J.J.; Ranes, B.; Brignol, N.; Hamler, R.; Clark, S. The origins of glucosylsphingosine in Gaucher disease. *Mol. Genet. Metab.* **2013**, *108*, S40–S41. [[CrossRef](#)]
19. Ferraz, M.J.; Marques, A.R.A.; Appelman, M.D.; Verhoek, M.; Strijland, A.; Mirzaian, M.; Scheij, S.; Ouairy, C.M.; Lahav, D.; Wisse, P.; et al. Lysosomal glycosphingolipid catabolism by acid ceramidase: Formation of glycosphingoid bases during deficiency of glycosidases. *FEBS Lett.* **2016**, *590*, 716–725. [[CrossRef](#)]
20. Mistry, P.K.; Batista, J.L.; Andersson, H.C.; Balwani, M.; Burrow, T.A.; Charrow, J.; Kaplan, P.; Khan, A.; Kishnani, P.S.; Kolodny, E.H.; et al. Transformation in pretreatment manifestations of Gaucher disease type 1 during two decades of alglucerase/imiglucerase enzyme replacement therapy in the International Collaborative Gaucher Group (ICGG) Gaucher Registry. *Am. J. Hematol.* **2017**, *92*, 929–939. [[CrossRef](#)]
21. Stirnemann, J.; Belmontou, N.; Camou, F.; Serratrice, C.; Froissart, R.; Caillaud, C.; Levade, T.; Astudillo, L.; Serratrice, J.; Brassier, A.; et al. A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 441. [[CrossRef](#)]
22. Belmontou, N.; Di Rocco, M.; Fraga, C.; Giraldo, P.; Hughes, D.; Lukina, E.; Maison-Blanche, P.; Merkel, M.; Niederau, C.; Plöckinger, U.; et al. Management and monitoring recommendations for the use of eliglustat in adults with type 1 Gaucher disease in Europe. *Eur. J. Intern. Med.* **2017**, *37*, 25–32. [[CrossRef](#)]
23. 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**, *22*, 179–184. [[CrossRef](#)]
24. Bruckstein, A.H.; Karanas, A.; Dire, J.J. Gaucher's disease associated with Hodgkin's disease. *Am. J. Med.* **1980**, *68*, 610–613. [[CrossRef](#)]
25. Burstein, Y.; Rechavi, G.; Rausen, A.R.; Frisch, B.; Spierer, Z. Association of Gaucher's disease and lymphoid malignancy in 2 children. *Scand. J. Haematol.* **1985**, *35*, 445–447. [[CrossRef](#)]
26. Chang-Lo, M.; Yam, L.T.; Rubenstone, A.I.; Schwartz, S.O. Gaucher's disease associated with chronic lymphocytic leukaemia, gout and carcinoma. *J. Pathol.* **1975**, *116*, 203–207. [[CrossRef](#)]
27. Corbett, G.M.; Darbyshire, P.J.; Besley, G.T.; Parker, A.C. Adult Gaucher disease in association with acute leukaemia. *Postgrad. Med. J.* **1987**, *63*, 899–900. [[CrossRef](#)]
28. 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**, *142*, 2229–2230. [[CrossRef](#)]
29. Lee, R.E. The pathology of Gaucher disease. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1982**, *95*, 177–217.
30. Marti, G.E.; Ryan, E.T.; Papadopoulos, N.M.; Filling-Katz, M.; Barton, N.; Fleischer, T.A.; Rick, M.; Gralnick, H.R. Polyclonal B-cell lymphocytosis and hypergammaglobulinemia in patients with Gaucher disease. *Am. J. Hematol.* **1988**, *29*, 189–194. [[CrossRef](#)]
31. De Fost, M.; Out, T.A.; de Wilde, F.A.; Tjin, E.P.M.; Pals, S.T.; van Oers, M.H.J.; Boot, R.G.; Aerts, J.F.M.G.; Maas, M.; Vom Dahl, S.; 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**, *87*, 439–449. [[CrossRef](#)]
32. Kyle, R.A.; Therneau, T.M.; Rajkumar, S.V.; Offord, J.R.; Larson, D.R.; Plevak, M.F.; Melton, L.J. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 564–569. [[CrossRef](#)]
33. Shiran, A.; Brenner, B.; Laor, A.; Tatarsky, I. Increased risk of cancer in patients with Gaucher disease. *Cancer* **1993**, *72*, 219–224. [[CrossRef](#)]
34. Arends, M.; van Dussen, L.; Biegstraaten, M.; Hollak, C.E.M. Malignancies and monoclonal gammopathy in Gaucher disease; a systematic review of the literature. *Br. J. Haematol.* **2013**, *161*, 832–842. [[CrossRef](#)]
35. Zimran, A.; Liphshitz, I.; Barchana, M.; Abrahamov, A.; Elstein, D. Incidence of malignancies among patients with type I Gaucher disease from a single referral clinic. *Blood Cells Mol. Dis.* **2005**, *34*, 197–200. [[CrossRef](#)]

36. Rosenbloom, B.E.; Weinreb, N.J.; Zimran, A.; Kacena, K.A.; Charrow, J.; Ward, E. Gaucher disease and cancer incidence: A study from the Gaucher Registry. *Blood* **2005**, *105*, 4569–4572. [[CrossRef](#)]
37. De Fost, M.; Vom Dahl, S.; Weverling, G.J.; Brill, N.; Brett, S.; Häussinger, D.; Hollak, C.E.M. Increased incidence of cancer in adult Gaucher disease in Western Europe. *Blood Cells Mol. Dis.* **2006**, *36*, 53–58. [[CrossRef](#)]
38. Taddei, T.H.; Kacena, K.A.; Yang, M.; Yang, R.; Malhotra, A.; Boxer, M.; Aleck, K.A.; Rennert, G.; Pastores, G.M.; Mistry, P.K. The underrecognized progressive nature of N370S Gaucher disease and assessment of cancer risk in 403 patients. *Am. J. Hematol.* **2009**, *84*, 208–214. [[CrossRef](#)]
39. Murugesan, V.; Lischuk, A.; Haims, A.; Lackman, R.; Brooks, J.S.; Mankin, H.; Mistry, P.K. Case series and literature review of skeletal tumors and their incidence in the Gaucher disease population. *Am. J. Hematol.* **2016**, *91*, 736–741. [[CrossRef](#)]
40. Landgren, O.; Turesson, I.; Gridley, G.; Caporaso, N.E. Risk of malignant disease among 1525 adult male US Veterans with Gaucher disease. *Arch. Intern. Med.* **2007**, *167*, 1189–1194. [[CrossRef](#)]
41. Jaffe, D.H.; Flaks-Manov, N.; Benis, A.; Gabay, H.; DiBonaventura, M.; Rosenbaum, H.; Joseph, A.; Bachrach, A.; Leventer-Roberts, M. Population-based cohort of 500 patients with Gaucher disease in Israel. *BMJ Open* **2019**, *9*, e024251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Stirnemann, J.; (Service de Médecine Interne, Hôpitaux Universitaires de Genève, Genève, Switzerland). Personal communication, 2019.
43. Stirnemann, J.; Vigan, M.; Hamroun, D.; Heraoui, D.; Rossi-Semerano, L.; Berger, M.G.; Rose, C.; Camou, F.; de Roux-Serratrice, C.; Grosbois, B.; et al. The French Gaucher's disease registry: Clinical characteristics, complications and treatment of 562 patients. *Orphanet J. Rare Dis.* **2012**, *7*, 77. [[CrossRef](#)]
44. Lo, S.M.; Stein, P.; Mullaly, S.; Bar, M.; Jain, D.; Pastores, G.M.; Mistry, P.K. Expanding spectrum of the association between Type 1 Gaucher disease and cancers: A series of patients with up to 3 sequential cancers of multiple types—correlation with genotype and phenotype. *Am. J. Hematol.* **2010**, *85*, 340–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Boven, L.A.; van Meurs, M.; Boot, R.G.; Mehta, A.; Boon, L.; Aerts, J.M.; Laman, J.D. Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. *Am. J. Clin. Pathol.* **2004**, *122*, 359–369. [[CrossRef](#)]
46. Allen, M.J.; Myer, B.J.; Khokher, A.M.; Rushton, N.; Cox, T.M. Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: Increased release of interleukin-6 and interleukin-10. *QJM* **1997**, *90*, 19–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Michelakakis, H.; Spanou, C.; Kondyli, A.; Dimitriou, E.; Van Weely, S.; Hollak, C.E.; Van Oers, M.H.; Aerts, J.M. Plasma tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels in Gaucher disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1317*, 219–222. [[CrossRef](#)]
48. Hollak, C.E.; Evers, L.; Aerts, J.M.; van Oers, M.H. Elevated levels of M-CSF, sCD14 and IL8 in type 1 Gaucher disease. *Blood Cells Mol. Dis.* **1997**, *23*, 201–212. [[CrossRef](#)]
49. Kitatani, K.; Wada, M.; Perry, D.; Usui, T.; Sun, Y.; Obeid, L.M.; Yaegashi, N.; Grabowski, G.A.; Hannun, Y.A. Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Gaucher's Disease. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0136633. [[CrossRef](#)]
50. Sun, Y.; Ran, H.; Liou, B.; Quinn, B.; Zamzow, M.; Zhang, W.; Bielawski, J.; Kitatani, K.; Setchell, K.D.R.; Hannun, Y.A.; et al. Isofagomine in vivo effects in a neuronopathic Gaucher disease mouse. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e19037. [[CrossRef](#)]
51. Kitatani, K.; Sheldon, K.; Rajagopalan, V.; Anelli, V.; Jenkins, R.W.; Sun, Y.; Grabowski, G.A.; Obeid, L.M.; Hannun, Y.A. Involvement of acid beta-glucosidase 1 in the salvage pathway of ceramide formation. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 12972–12978. [[CrossRef](#)]
52. Kitatani, K.; Idkowiak-Baldys, J.; Bielawski, J.; Taha, T.A.; Jenkins, R.W.; Senkal, C.E.; Ogretmen, B.; Obeid, L.M.; Hannun, Y.A. Protein kinase C-induced activation of a ceramide/protein phosphatase 1 pathway leading to dephosphorylation of p38 MAPK. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 36793–36802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Kitatani, K.; Sheldon, K.; Anelli, V.; Jenkins, R.W.; Sun, Y.; Grabowski, G.A.; Obeid, L.M.; Hannun, Y.A. Acid beta-glucosidase 1 counteracts p38 δ -dependent induction of interleukin-6: Possible role for ceramide as an anti-inflammatory lipid. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 12979–12988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

54. Ivanova, M.; Limgala, R.P.; Changsila, E.; Kamath, R.; Ioanou, C.; Goker-Alpan, O. Gaucheromas: When macrophages promote tumor formation and dissemination. *Blood Cells Mol. Dis.* **2018**, *68*, 100–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Yeung, O.W.H.; Lo, C.-M.; Ling, C.-C.; Qi, X.; Geng, W.; Li, C.-X.; Ng, K.T.P.; Forbes, S.J.; Guan, X.-Y.; Poon, R.T.P.; et al. Alternatively activated (M2) macrophages promote tumour growth and invasiveness in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **2015**, *62*, 607–616. [[CrossRef](#)]
56. Xu, Y.-H.; Quinn, B.; Witte, D.; Grabowski, G.A. Viable mouse models of acid beta-glucosidase deficiency: The defect in Gaucher disease. *Am. J. Pathol.* **2003**, *163*, 2093–2101. [[CrossRef](#)]
57. Pandey, M.K.; Rani, R.; Zhang, W.; Setchell, K.; Grabowski, G.A. Immunological cell type characterization and Th1-Th17 cytokine production in a mouse model of Gaucher disease. *Mol. Genet. Metab.* **2012**, *106*, 310–322. [[CrossRef](#)]
58. Pandey, M.K.; Jabre, N.A.; Xu, Y.-H.; Zhang, W.; Setchell, K.D.R.; Grabowski, G.A. Gaucher disease: Chemotactic factors and immunological cell invasion in a mouse model. *Mol. Genet. Metab.* **2014**, *111*, 163–171. [[CrossRef](#)]
59. Lukas, J.; Cozma, C.; Yang, F.; Kramp, G.; Meyer, A.; Neßlauer, A.-M.; Eichler, S.; Böttcher, T.; Witt, M.; Bräuer, A.; et al. Glucosylsphingosine Causes Hematological and Visceral Changes in Mice—Evidence for a Pathophysiological Role in Gaucher Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2192. [[CrossRef](#)]
60. Nagata, M.; Izumi, Y.; Ishikawa, E.; Kiyotake, R.; Doi, R.; Iwai, S.; Omahdi, Z.; Yamaji, T.; Miyamoto, T.; Bamba, T.; et al. Intracellular metabolite β -glucosylceramide is an endogenous Mincle ligand possessing immunostimulatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E3285–E3294. [[CrossRef](#)]
61. Marshall, J.; McEachern, K.A.; Chuang, W.-L.; Hutto, E.; Siegel, C.S.; Shayman, J.A.; Grabowski, G.A.; Scheule, R.K.; Copeland, D.P.; Cheng, S.H. 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**, *33*, 281–289. [[CrossRef](#)]
62. Nair, S.; Boddupalli, C.S.; Verma, R.; Liu, J.; Yang, R.; Pastores, G.M.; Mistry, P.K.; Dhodapkar, M.V. Type II NKT-TFH cells against Gaucher lipids regulate B-cell immunity and inflammation. *Blood* **2015**, *125*, 1256–1271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Nair, S.; Sng, J.; Boddupalli, C.S.; Seckinger, A.; Chesi, M.; Fulciniti, M.; Zhang, L.; Rauniyar, N.; Lopez, M.; Neparidze, N.; et al. Antigen-mediated regulation in monoclonal gammopathies and myeloma. *JCI Insight* **2018**, *3*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Nair, S.; Branagan, A.R.; Liu, J.; Boddupalli, C.S.; Mistry, P.K.; Dhodapkar, M.V. Clonal Immunoglobulin against Lysolipids in the Origin of Myeloma. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 555–561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Pandey, M.K.; Burrow, T.A.; Rani, R.; Martin, L.J.; Witte, D.; Setchell, K.D.; Mckay, M.A.; Magnusen, A.F.; Zhang, W.; Liou, B.; et al. Complement drives glucosylceramide accumulation and tissue inflammation in Gaucher disease. *Nature* **2017**, *543*, 108–112. [[CrossRef](#)]
66. Mizukami, H.; Mi, Y.; Wada, R.; Kono, M.; Yamashita, T.; Liu, Y.; Werth, N.; Sandhoff, R.; Sandhoff, K.; Proia, R.L. Systemic inflammation in glucocerebrosidase-deficient mice with minimal glucosylceramide storage. *J. Clin. Invest.* **2002**, *109*, 1215–1221. [[CrossRef](#)]
67. Pavlova, E.V.; Wang, S.Z.; Archer, J.; Dekker, N.; Aerts, J.M.F.G.; Karlsson, S.; Cox, T.M. B cell lymphoma and myeloma in murine Gaucher's disease. *J. Pathol.* **2013**, *231*, 88–97. [[CrossRef](#)]
68. Mistry, P.K.; Liu, J.; Yang, M.; Nottoli, T.; McGrath, J.; Jain, D.; Zhang, K.; Keutzer, J.; Chuang, W.-L.; Mehal, W.Z.; et al. Glucocerebrosidase gene-deficient mouse recapitulates Gaucher disease displaying cellular and molecular dysregulation beyond the macrophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 19473–19478. [[CrossRef](#)]
69. Liu, J.; Halene, S.; Yang, M.; Iqbal, J.; Yang, R.; Mehal, W.Z.; Chuang, W.-L.; Jain, D.; Yuen, T.; Sun, L.; et al. Gaucher disease gene GBA functions in immune regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 10018–10023. [[CrossRef](#)]
70. Pavlova, E.V.; Archer, J.; Wang, S.; Dekker, N.; Aerts, J.M.; Karlsson, S.; Cox, T.M. Inhibition of UDP-glucosylceramide synthase in mice prevents Gaucher disease-associated B-cell malignancy. *J. Pathol.* **2015**, *235*, 113–124. [[CrossRef](#)]
71. Dasari, S.K.; Bialik, S.; Levin-Zaidman, S.; Levin-Salomon, V.; Merrill, A.H.; Futerman, A.H.; Kimchi, A. Signalome-wide RNAi screen identifies GBA1 as a positive mediator of autophagic cell death. *Cell Death Differ.* **2017**, *24*, 1288–1302. [[CrossRef](#)]

72. Sun, Y.; Liou, B.; Ran, H.; Skelton, M.R.; Williams, M.T.; Vorhees, C.V.; Kitatani, K.; Hannun, Y.A.; Witte, D.P.; Xu, Y.-H.; et al. Neuronopathic Gaucher disease in the mouse: Viable combined selective saposin C deficiency and mutant glucocerebrosidase (V394L) mice with glucosylsphingosine and glucosylceramide accumulation and progressive neurological deficits. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19*, 1088–1097. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Osellame, L.D.; Rahim, A.A.; Hargreaves, I.P.; Gegg, M.E.; Richard-Londt, A.; Brandner, S.; Waddington, S.N.; Schapira, A.H.V.; Duchon, M.R. Mitochondria and quality control defects in a mouse model of Gaucher disease—links to Parkinson’s disease. *Cell Metab.* **2013**, *17*, 941–953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Tatti, M.; Motta, M.; Di Bartolomeo, S.; Scarpa, S.; Cianfanelli, V.; Cecconi, F.; Salvioli, R. Reduced cathepsins B and D cause impaired autophagic degradation that can be almost completely restored by overexpression of these two proteases in Sap C-deficient fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 5159–5173. [[CrossRef](#)]
75. Aflaki, E.; Moaven, N.; Borger, D.K.; Lopez, G.; Westbroek, W.; Chae, J.J.; Marugan, J.; Patnaik, S.; Maniawang, E.; Gonzalez, A.N.; et al. Lysosomal storage and impaired autophagy lead to inflammasome activation in Gaucher macrophages. *Aging Cell* **2016**, *15*, 77–88. [[CrossRef](#)]
76. Kinghorn, K.J.; Grönke, S.; Castillo-Quan, J.I.; Woodling, N.S.; Li, L.; Sirka, E.; Gegg, M.; Mills, K.; Hardy, J.; Bjedov, I.; et al. A Drosophila Model of Neuronopathic Gaucher Disease Demonstrates Lysosomal-Autophagic Defects and Altered mTOR Signalling and Is Functionally Rescued by Rapamycin. *J. Neurosci.* **2016**, *36*, 11654–11670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Panicker, L.M.; Miller, D.; Park, T.S.; Patel, B.; Azevedo, J.L.; Awad, O.; Masood, M.A.; Veenstra, T.D.; Goldin, E.; Stubblefield, B.K.; et al. Induced pluripotent stem cell model recapitulates pathologic hallmarks of Gaucher disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 18054–18059. [[CrossRef](#)]
78. Brown, R.A.; Voit, A.; Srikanth, M.P.; Thayer, J.A.; Kingsbury, T.J.; Jacobson, M.A.; Lipinski, M.M.; Feldman, R.A.; Awad, O. mTOR hyperactivity mediates lysosomal dysfunction in Gaucher’s disease iPSC-neuronal cells. *Dis. Model Mech.* **2019**, *12*, dmm038596. [[CrossRef](#)]
79. Sardiello, M.; Palmieri, M.; di Ronza, A.; Medina, D.L.; Valenza, M.; Gennarino, V.A.; Malta, C.D.; Donaudy, F.; Embrione, V.; Polishchuk, R.S.; et al. A Gene Network Regulating Lysosomal Biogenesis and Function. *Science* **2009**, *325*, 473–477. [[CrossRef](#)]
80. Martina, J.A.; Chen, Y.; Gucek, M.; Puertollano, R. MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* **2012**, *8*, 903–914. [[CrossRef](#)]
81. Cortes, C.J.; La Spada, A.R. TFEB dysregulation as a driver of autophagy dysfunction in neurodegenerative disease: Molecular mechanisms, cellular processes, and emerging therapeutic opportunities. *Neurobiol. Dis.* **2019**, *122*, 83–93. [[CrossRef](#)]
82. Awad, O.; Sarkar, C.; Panicker, L.M.; Miller, D.; Zeng, X.; Sgambato, J.A.; Lipinski, M.M.; Feldman, R.A. Altered TFEB-mediated lysosomal biogenesis in Gaucher disease iPSC-derived neuronal cells. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 5775–5788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Singh, S.S.; Vats, S.; Chia, A.Y.-Q.; Tan, T.Z.; Deng, S.; Ong, M.S.; Arfuso, F.; Yap, C.T.; Goh, B.C.; Sethi, G.; et al. Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene* **2018**, *37*, 1142–1158. [[CrossRef](#)]
84. White, E.; Mehnert, J.M.; Chan, C.S. Autophagy, Metabolism, and Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 5037–5046. [[CrossRef](#)]
85. Park, S.M.; Ou, J.; Chamberlain, L.; Simone, T.M.; Yang, H.; Virbasius, C.-M.; Ali, A.M.; Zhu, L.J.; Mukherjee, S.; Raza, A.; et al. U2AF35(S34F) Promotes Transformation by Directing Aberrant ATG7 Pre-mRNA 3’ End Formation. *Mol. Cell* **2016**, *62*, 479–490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Galluzzi, L.; Bravo-San Pedro, J.M.; Kroemer, G. Defective Autophagy Initiates Malignant Transformation. *Mol. Cell* **2016**, *62*, 473–474. [[CrossRef](#)]
87. Li, S.; Song, Y.; Quach, C.; Guo, H.; Jang, G.-B.; Maazi, H.; Zhao, S.; Sands, N.A.; Liu, Q.; In, G.K.; et al. Transcriptional regulation of autophagy-lysosomal function in BRAF-driven melanoma progression and chemoresistance. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Magnuson, B.; Ekim, B.; Fingar, D.C. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem. J.* **2012**, *441*, 1–21. [[CrossRef](#)]
89. Pópulo, H.; Soares, P.; Faustino, A.; Rocha, A.S.; Silva, P.; Azevedo, F.; Lopes, J.M. mTOR pathway activation in cutaneous melanoma is associated with poorer prognosis characteristics. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2011**, *24*, 254–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Blanz, J.; Saftig, P. Parkinson’s disease: Acid-glucocerebrosidase activity and alpha-synuclein clearance. *J. Neurochem.* **2016**, *139* (Suppl. 1), 198–215. [[CrossRef](#)]

91. Do, J.; McKinney, C.; Sharma, P.; Sidransky, E. Glucocerebrosidase and its relevance to Parkinson disease. *Mol. Neurodegener.* **2019**, *14*, 36. [[CrossRef](#)]
92. Barkhuizen, M.; Anderson, D.G.; Grobler, A.F. Advances in GBA-associated Parkinson's disease—Pathology, presentation and therapies. *Neurochem. Int.* **2016**, *93*, 6–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Wahabi, K.; Perwez, A.; Rizvi, M.A. Parkin in Parkinson's Disease and Cancer: A Double-Edged Sword. *Mol. Neurobiol.* **2018**, *55*, 6788–6800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Pan, T.; Li, X.; Jankovic, J. The association between Parkinson's disease and melanoma. *Int. J. Cancer* **2011**, *128*, 2251–2260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Rodriguez-Leyva, I.; Chi-Ahumada, E.; Mejía, M.; Castanedo-Cazares, J.P.; Eng, W.; Saikaly, S.K.; Carrizales, J.; Levine, T.D.; Norman, R.A.; Jimenez-Capdeville, M.E. The Presence of Alpha-Synuclein in Skin from Melanoma and Patients with Parkinson's Disease. *Mov. Disord. Clin. Pract.* **2017**, *4*, 724–732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Israeli, E.; Yakunin, E.; Zerbiv, Y.; Hacoheh-Solovich, A.; Kisos, H.; Loeb, V.; Lichtenstein, M.; Ben-Gedalya, T.; Sabag, O.; Pikarsky, E.; et al. α -Synuclein Expression Selectively Affects Tumorigenesis in Mice Modeling Parkinson's Disease. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e19622. [[CrossRef](#)]
97. Nandakumar, S.; Vijayan, B.; Kishore, A.; Thekkuveettil, A. Autophagy enhancement is rendered ineffective in presence of α -synuclein in melanoma cells. *J. Cell Commun. Signal.* **2017**, *11*, 381–394. [[CrossRef](#)]
98. Mazzulli, J.R.; Xu, Y.-H.; Sun, Y.; Knight, A.L.; McLean, P.J.; Caldwell, G.A.; Sidransky, E.; Grabowski, G.A.; Krainc, D. Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell* **2011**, *146*, 37–52. [[CrossRef](#)]
99. Taguchi, Y.V.; Liu, J.; Ruan, J.; Pacheco, J.; Zhang, X.; Abbasi, J.; Keutzer, J.; Mistry, P.K.; Chandra, S.S. Glucosylsphingosine Promotes α -Synuclein Pathology in Mutant GBA-Associated Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* **2017**, *37*, 9617–9631. [[CrossRef](#)]
100. Maor, G.; Rapaport, D.; Horowitz, M. The effect of mutant GBA1 on accumulation and aggregation of α -synuclein. *Hum. Mol. Genet.* **2019**, *28*, 1768–1781. [[CrossRef](#)]
101. Gatto, E.M.; Da Prat, G.; Etcheverry, J.L.; Drelichman, G.; Cesarini, M. Parkinsonisms and Glucocerebrosidase Deficiency: A Comprehensive Review for Molecular and Cellular Mechanism of Glucocerebrosidase Deficiency. *Brain Sci.* **2019**, *9*, 30. [[CrossRef](#)]
102. Fernandes, H.J.R.; Hartfield, E.M.; Christian, H.C.; Emmanouilidou, E.; Zheng, Y.; Booth, H.; Bogetofte, H.; Lang, C.; Ryan, B.J.; Sardi, S.P.; et al. ER Stress and Autophagic Perturbations Lead to Elevated Extracellular α -Synuclein in GBA-N370S Parkinson's iPSC-Derived Dopamine Neurons. *Stem Cell Rep.* **2016**, *6*, 342–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Ron, I.; Horowitz, M. ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity. *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, 2387–2398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Ron, I.; Rapaport, D.; Horowitz, M. Interaction between parkin and mutant glucocerebrosidase variants: A possible link between Parkinson disease and Gaucher disease. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19*, 3771–3781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Bendikov-Bar, I.; Rapaport, D.; Larisch, S.; Horowitz, M. Parkin-mediated ubiquitination of mutant glucocerebrosidase leads to competition with its substrates PARIS and ARTS. *Orphanet J. Rare Dis.* **2014**, *9*, 86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Cubillos-Ruiz, J.R.; Bettigole, S.E.; Glimcher, L.H. Tumorigenic and Immunosuppressive Effects of Endoplasmic Reticulum Stress in Cancer. *Cell* **2017**, *168*, 692–706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Yan, D.; Wang, H.-W.; Bowman, R.L.; Joyce, J.A. STAT3 and STAT6 Signaling Pathways Synergize to Promote Cathepsin Secretion from Macrophages via IRE1 α Activation. *Cell Rep.* **2016**, *16*, 2914–2927. [[CrossRef](#)]
108. Cabasso, O.; Paul, S.; Dorot, O.; Maor, G.; Krivoruk, O.; Pasmanik-Chor, M.; Mirzaian, M.; Ferraz, M.; Aerts, J.; Horowitz, M. Drosophila melanogaster Mutated in its GBA1b Ortholog Recapitulates Neuronopathic Gaucher Disease. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1420. [[CrossRef](#)]
109. Sun, Y.; Zhang, W.; Xu, Y.-H.; Quinn, B.; Dasgupta, N.; Liou, B.; Setchell, K.D.R.; Grabowski, G.A. Substrate compositional variation with tissue/region and Gba1 mutations in mouse models—implications for Gaucher disease. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e57560. [[CrossRef](#)]

110. Chipeaux, C.; de Person, M.; Burguet, N.; Billette de Villemeur, T.; Rose, C.; Belmatoug, N.; Héron, S.; Le Van Kim, C.; Franco, M.; Moussa, F. Optimization of ultra-high pressure liquid chromatography—Tandem mass spectrometry determination in plasma and red blood cells of four sphingolipids and their evaluation as biomarker candidates of Gaucher’s disease. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1525*, 116–125. [[CrossRef](#)]
111. Dekker, N.; van Dussen, L.; Hollak, C.E.M.; Overkleeft, H.; Scheij, S.; Ghauharali, K.; van Breemen, M.J.; Ferraz, M.J.; Groener, J.E.M.; Maas, M.; et al. Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: Relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response. *Blood* **2011**, *118*, e118–e127. [[CrossRef](#)]
112. Sardi, S.P.; Clarke, J.; Kinnecom, C.; Tamsett, T.J.; Li, L.; Stanek, L.M.; Passini, M.A.; Grabowski, G.A.; Schlossmacher, M.G.; Sidman, R.L.; et al. CNS expression of glucocerebrosidase corrects alpha-synuclein pathology and memory in a mouse model of Gaucher-related synucleinopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 12101–12106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Astudillo, L. Rôle des sphingolipides dans la cancérogenèse: L’exemple de la maladie de Gaucher. Ph.D. Thesis, Université Toulouse III - Paul Sabatier, Toulouse, France, 2016.
114. Xu, Y.-H.; Jia, L.; Quinn, B.; Zamzow, M.; Stringer, K.; Aronow, B.; Sun, Y.; Zhang, W.; Setchell, K.D.; Grabowski, G.A. Global gene expression profile progression in Gaucher disease mouse models. *BMC Genom.* **2011**, *12*, 20. [[CrossRef](#)]
115. Barak, V.; Acker, M.; Nisman, B.; Kalickman, I.; Abrahamov, A.; Zimran, A.; Yatziv, S. Cytokines in Gaucher’s disease. *Eur. Cytokine Netw.* **1999**, *10*, 205–210. [[PubMed](#)]
116. Maceyka, M.; Harikumar, K.B.; Milstien, S.; Spiegel, S. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol.* **2012**, *22*, 50–60. [[CrossRef](#)]
117. Mistry, P.K.; Liu, J.; Sun, L.; Chuang, W.-L.; Yuen, T.; Yang, R.; Lu, P.; Zhang, K.; Li, J.; Keutzer, J.; et al. Glucocerebrosidase 2 gene deletion rescues type 1 Gaucher disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 4934–4939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



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